

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE REMODELAMENTO
CARDIOVASCULAR, ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA
MMP-2 DECORRENTES DA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

CARLA RENATA KITANISHI ANTONIETTO

RIBEIRÃO PRETO - SP
Dezembro - 2021

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE REMODELAMENTO
CARDIOVASCULAR, ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA
MMP-2 DECORRENTES DA HIPERTENSÃO ARTERIAL**

CARLA RENATA KITANISHI ANTONIETTO

Orientadora: Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez

Dissertação apresentada a Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Aplicada à Saúde.

RIBEIRÃO PRETO - SP

Dezembro - 2021

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Antonietto, Carla Renata Kitanishi, 1977-
A635e Efeitos da curcumina sobre remodelamento cardiovascular,
estresse oxidativo e atividade da mmp-2 decorrentes da hipertensão
arterial / Carla Renata Kitanishi Antonietto. - - Ribeirão Preto, 2022.
43 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elen Rizzi Sanchez.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia aplicada à saúde. Ribeirão Preto, 2022.

1. Hipertensão. 2. Curcumina. 3. MMP-2. 4. Remodelamento
Cardiovascular. I. Título.

CDD 660.6

CARLA RENATA KITANISHI ANTONIETTO

**EFEITOS DA CURCUMINA SOBRE REMODELAMENTO CARDIOVASCULAR,
ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DA MMP-2 DECORRENTES DA
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

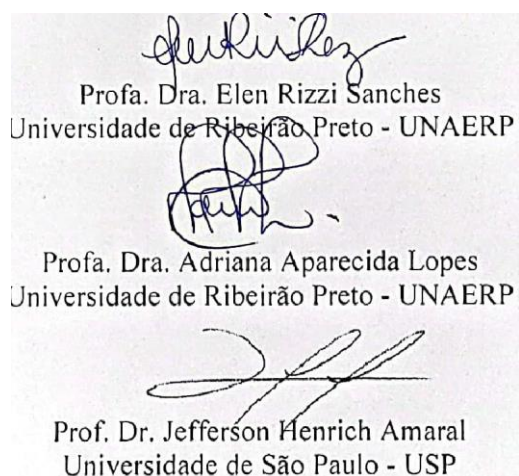
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 22 de dezembro de 2021

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA



RIBEIRÃO PRETO

2021

Dedico esse trabalho
a minha orientadora Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez,
por todo incentivo, confiança e amadurecimento acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades trilhadas nos meus caminhos sempre me acompanhando e abençoando.

Ao meu marido Márcio Augusto Antonietto e meu filho Enzo Kitanishi Antonietto, por todo amor, companheirismo, apoio e compreensão.

Aos meus familiares pelo incentivo, apoio e carinho em especial minha mãe, Zélia Maria Ribeiro Kitanishi, que desde sempre me incentivou a trilhar nos caminhos da pós-graduação.

A minha orientadora, Profa. Dra. Elen Rizzi Sanchez, sem dúvida a maior incentivadora desse trabalho e da minha carreira acadêmica. Agradeço por todo apoio, confiança, dedicação, paciência e ensinamentos que me ajudam a evoluir como profissional e pessoa. E claro pela amiga que se tornou, a qual admiro em todas as versões, cientista, mulher, mãe, filha, amiga. Devo e dedico essa conquista a você.

A Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP pela bolsa de estudos concedida.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

A Profa. Dra. Leandra Náira Zambelli Ramalho professora associada do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), pela atenção e colaboração com esse trabalho.

Ao mestrando em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) Gustavo Félix Pimenta e a Farmacêutica Júlia Ramazza Maschio que iniciaram esse trabalho no período de iniciação científica e se tornaram amigos.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular pela convivência diária, conversas, conselhos, afeto e amizade. Vocês são essenciais no meu dia a dia.

As colaboradoras e colegas de trabalho da Unidade de Biotecnologia agradeço o apoio e a convivência.

Á todos muito obrigada!

RESUMO

A hipertensão é uma doença multifatorial considerada um importante problema de saúde pública. Alterações vasculares decorrentes da hipertensão resultam em intenso remodelamento vascular envolvendo a ativação das metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), principalmente MMP-2. O estresse oxidativo pode contribuir para a fisiopatologia da hipertensão, sendo considerado um dos principais fatores que ativam a MMP-2. Dessa maneira, o efeito benéfico de drogas antioxidantes pode estar associado com a redução da atividade da MMP-2. A Curcumina possui ação anti-hipertensiva e antioxidante e pode resultar na inibição da MMP-2. Porém, ainda é incerto se a curcumina diminui a atividade da MMP-2 na hipertensão. Portanto, a hipótese do presente estudo é que a curcumina previne o aumento na pressão arterial, a hipertrofia cardiovascular, o estresse oxidativo e inibe a ativação da MMP-2 na aorta e coração de ratos hipertensos. Para avaliar esta hipótese, a hipertensão arterial foi induzida pelo tratamento com L-NAME. Animais controle e L-NAME foram simultaneamente tratados por duas semanas com veículo e curcumina na dose de 50 mg/Kg/dia (CUR50) ou 100 mg/Kg/dia (CUR100). A pressão arterial foi avaliada semanalmente por pletismografia de cauda. O estresse oxidativo plasmático e atividade da MMP-2 cardíaca e vascular foram avaliados por meio da reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e zimografia em gel contendo gelatina, respectivamente. Para avaliar se a curcumina pode ter efeitos diretos sobre a MMP-2, géis de zimografia foram incubados ou não com curcumina em diferentes concentrações. Os animais tratados com L-NAME apresentaram aumento significativo na pressão arterial (176 ± 4 mmHg) e no TBARS (77 ± 7 mM) quando comparados com o grupo controle (125 ± 3 mmHg e 62 ± 4 mM; $p<0,05$). Os grupos L-NAME tratados com CUR50 e CUR100 apresentaram redução nos valores pressóricos ao final do tratamento (redução de 14 mmHg e 19 mmHg, respectivamente; $p<0,05$ vs L-NAME veículo). O remodelamento cardíaco e vascular encontrado nos animais hipertensos, foi revertido pelos tratamentos com curcumina independente da dose. O estresse oxidativo também foi menor nos animais hipertensos tratados com curcumina independente da dose administrada (CUR50: 55 ± 3 mM e CUR100: 63 ± 3 mM) quando comparados com o L-NAME veículo ($p<0,05$). Foi encontrado um aumento de 46% na expressão da MMP-2 ativa na aorta dos ratos L-NAME em comparação com o grupo controle ($p<0,05$), que foi revertido pelo tratamento com curcumina independente da dose ($p<0,05$ vs L-NAME veículo). Não houve aumento na MMP-2 no coração dos ratos hipertensos ($P>0,05$ L-name vs Sham). Foi observado que a curcumina, quando incubada diretamente no gel contendo MMP-2 e gelatina, inibiu a atividade dessa protease. Portanto, independente da dose, a curcumina promoveu efeitos anti-hipertensivos e antioxidantes que podem ter contribuído para menor ativação da MMP-2 na hipertensão induzida por L-NAME. Além dos efeitos antioxidantes, a curcumina pode inibir diretamente a MMP-2. Portanto, a redução na atividade da MMP-2 pode ser considerada um dos efeitos benéficos associados a curcumina na hipertensão independente da dose administrada.

Palavras-chave: Hipertensão, Curcumina, MMP-2, Remodelamento Cardiovascular.

ABSTRACT

Hypertension is a multifactorial disease considered an important public health problem. Vascular changes associated with hypertension result in intense vascular remodeling involving matrix metalloproteinases activation (MMP), especially MMP-2. Oxidative stress may contribute to hypertension pathophysiology, being described as the main MMP-2 activating factor. Thus, the beneficial effect of antioxidant drugs is also associated with MMP-2 reduction. Curcumin has antihypertensive and antioxidant action and could result in MMP-2 inhibition. However, it is still uncertain whether curcumin decreases MMP-2 activity in hypertension. The objective was evaluated whether MMP-2 inhibition may be one of the beneficial effects induced by Curcumin in hypertension. Wistar rats were used and arterial hypertension was induced by L-NAME treatment. Control and L-NAME animals were simultaneously treated for two weeks with vehicle, Curcumin at a dose of 50 mg/Kg/day (CUR50) or Curcumin at a dose of 100 mg/ kg/day (CUR100). Arterial pressure was assessed by tail plethimography. Plasma oxidative stress and vascular MMP-2 activity were evaluated by thiobarbituric acid reaction (TBARS) and gel zymography containing gelatin, respectively. L-NAME treated animals demonstrated significant increase in arterial pressure (176 ± 4 mmHg) and oxidative stress (77 ± 7 mM) when compared with the control group (125 ± 3 mmHg and 62 ± 4 mM; $p<0.05$). L-NAME treated with CUR50 and CUR100 showed a significant decrease in arterial pressure of 14 mmHg and 19 mmHg, respectively ($p<0.05$ vs L-NAME vehicle). Oxidative stress was also reduced in Curcumin treated hypertensive animals regardless the administered dose (CUR50: 55 ± 3 mM and CUR100: 63 ± 3 mM) when compared to L-NAME vehicle ($p<0.05$). A 46% increase in active MMP-2 expression was found in the aorta of L-NAME rats when compared with the control group ($p<0.05$), which was reversed by dose-independent curcumin treatment ($p<0, 05$ vs L-NAME vehicle). Curcumin promoted antihypertensive and antioxidant effects that may have contributed to a lower MMP-2 activation in L-NAME induced hypertension. Therefore, the reduction in MMP-2 activity may be considered as one of the beneficial effects associated to Curcumin in hypertension regardless of the administered dose.

Key-words: Hypertension, Curcumin, MMP-2, Vascular remodeling

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fatores de risco associados à hipertensão arterial.....	1
Figura 2: Representação gráfica da taxa de evolução de mortalidade associada às doenças cardiovasculares.....	2
Figura 3: Produção endotelial de óxido nítrico e sua ação na musculatura lisa vascular.....	5
Figura 4: Remodelamento vascular de pequenas e grandes artérias na hipertensão.....	7
Figura 5: Processo de remodelamento vascular que pode ocorrer durante a progressão da HA em vasos de grande calibre, como a aorta.....	8
Figura 6: A hipertensão induziu progressão da hipertrofia adaptativa para a hipertrofia mal adaptativa.....	10
Figura 7: Característica morfológica do remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão arterial crônica.....	10
Figura 8. Principais MMPs e suas características estruturais.....	11
Figura 9: Esquema ilustrativo da ativação de MMPs por ERON	13
Figura 10: Principais curcuminóides da cúrcuma e suas estruturas químicas.....	14
Figura 11: Esquema ilustrativo da cascata de sinalização intracelular ativada pelo aumento proteico de enzimas antioxidantes.....	16
Figura 12: Ligação de curcumina no sítio ativo da proteína MMP-2 conforme avaliado por docking molecular.....	17
Figura 13. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal.....	25
Figura 14. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre o remodelamento vascular.....	26
Figura 15. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre o remodelamento cardíaco.....	27
Figura 16. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a hipertrofia dos cardiomiócitos.....	28
Figura 17. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a expressão da MMP-2 em aorta.....	29
Figura 18. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a expressão da MMP-2 no ventrículo esquerdo cardíaco.....	30

Figura 19 - Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a formação de estresse oxidativo.....31

Figura 20 - Efeitos da incubação *in vitro* com diferentes concentrações de curcumina sobre a atividade da MMP-2 em aorta e coração de ratos não tratados.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da PA de acordo com a casual ou no consultório.....	3
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARE	Elementos de resposta antioxidante
AST	Área de secção transversal
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CUR	Curcumina
DCNT	Doença crônica não transmissível
DCV	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERON	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
GSH	Glutathiona peroxidase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
L-NAME	N-nitro-L-arginine methyl ester
MDA	Malonaldeído
M/L	Média / Lúmen
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
NADPH	β -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato
MMP	N-Etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
OCT	Optimal Cutting Temperature
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
PNS	Plano nacional de saúde
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

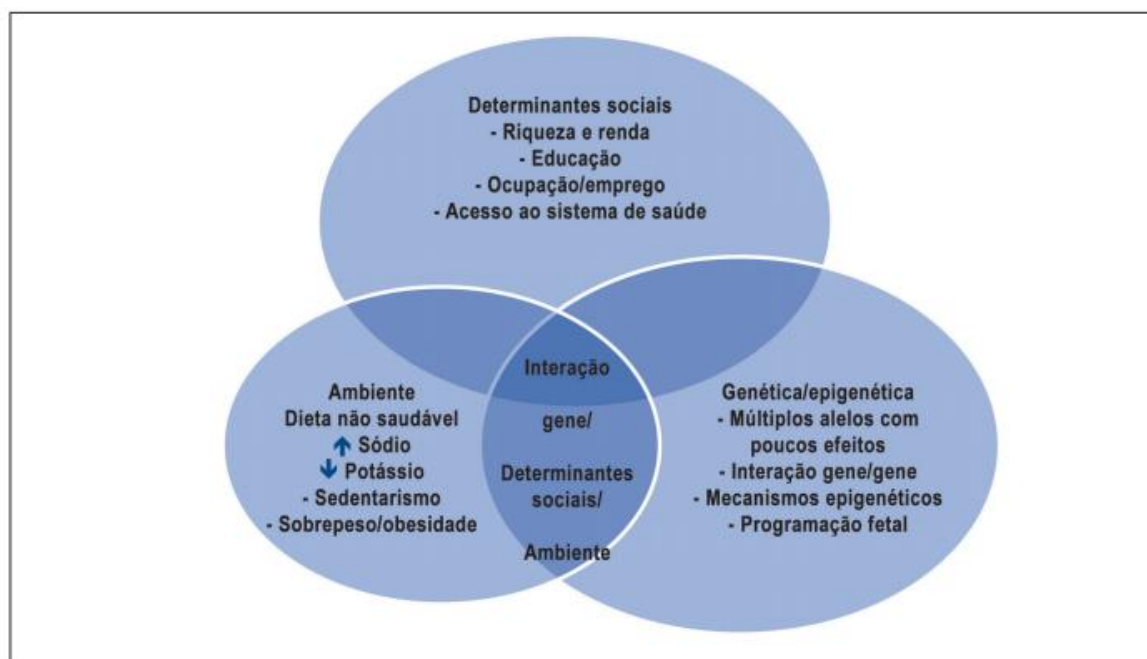
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hipertensão Arterial Sistêmica.....	1
1.2. Óxido Nítrico (NO) na Hipertensão Arterial.....	3
1.3. Alterações Cardiovasculares Associadas à HA	6
1.3.1. Remodelamento Vascular.....	6
1.3.2. Remodelamento Cardíaco.....	9
1.4. Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs)	11
1.5. Curcumina	14
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Geral	19
3.2. Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Considerações Gerais	20
4.2. Hipertensão Arterial induzida pela técnica L-NAME	20
4.3. Avaliação da Pressão Arterial.....	21
4.4. Avaliação de peso.....	21
4.5. Remodelamento Cardiovascular.....	21
4.6. Determinação da expressão de MMP-2 na aorta e coração por zimografia em gel	22
4.7. Avaliação da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS	23
4.8. Determinações da atividade da MMP-2 <i>in vitro</i>	23
4.9. Análises estatísticas	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Efeitos do tratamento com curcumina na pressão arterial e peso corporal dos animais	25
5.2 Efeitos do tratamento com curcumina no remodelamento vascular.....	26
5.3 Efeitos do tratamento com curcumina no remodelamento cardíaco.....	27
5.4 Efeitos do tratamento com curcumina na expressão das MMPs	28
5.5. Efeitos dos tratamentos com curcumina sobre o estresse oxidativo.....	30
5.6 Efeitos diretos da curcumina sobre a atividade da MMP-2 em aorta.....	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXO	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica não transmissível (DCNT), definida por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, destacando-se por ser um importante problema de saúde pública mundial. Trata-se de uma condição clínica multifatorial, que depende de fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais, sendo uma das principais causas associadas ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Os fatores ambientais incluem sobrepeso/obesidade, dieta não saudável, consumo excessivo de sódio, baixo consumo de potássio, sedentarismo, consumo de álcool e tabagismo (Figura 1) (CAREY et al., 2018). Por ser frequentemente assintomática evolui com lesões em órgãos-alvo como, por exemplo, cérebro, coração, rins e vasos. (BARROSO et al., 2020).

Figura 1: Fatores de risco associados a HA

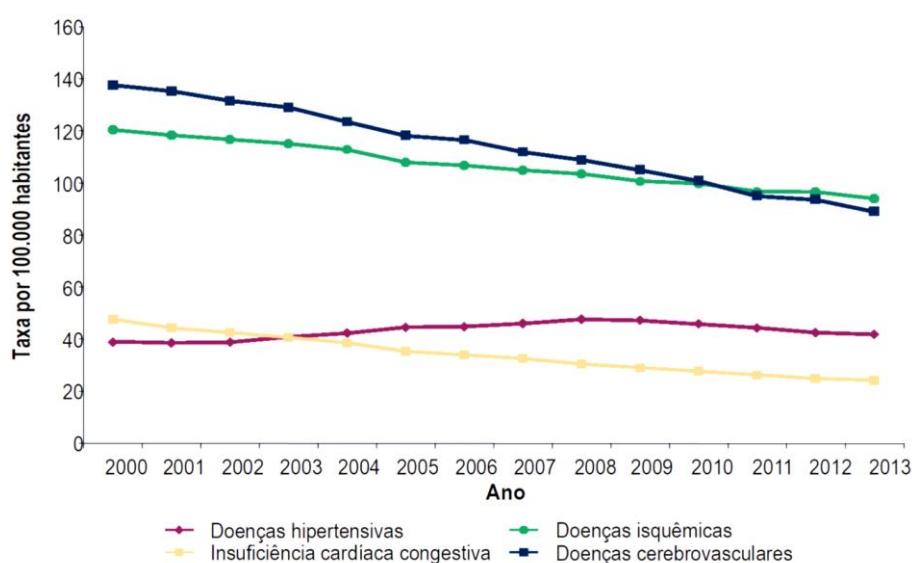


Fonte: Carey et al., 2018

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013, considerando as medidas de PA aferidas e uso de medicação anti-hipertensiva, o percentual de adultos hipertensos chegou a 32,3% (BARROSO et al., 2020).

No Brasil as DCV representam 22,6% das mortes prematuras (entre 30 e 69 anos de idade), sendo que em 2017 do total de óbitos 27,3% foram atribuídos a essas doenças. No período de uma década (2008 a 2017), foram estimadas 667.184 mortes atribuíveis à HA no Brasil (BARROSO et al., 2020). Inclusive, dentre todas as doenças cardiovasculares, a HA apresenta maior número de casos com o tempo, enquanto as demais mostram uma redução nos últimos anos (MALACHIAS, 2016) (Figura 2).

Figura 2. Representação gráfica da taxa de evolução de mortalidade associada as doenças cardiovasculares.



Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia 2016.

Em relação a custos ao Sistema Único de Saúde (SUS), os valores atribuíveis a HA são superiores ao da obesidade e diabetes mellitus. Em 2018, os gastos no SUS foram estimados em US\$ 523,7 milhões, com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos. Nos últimos dez anos, 77% dos custos com hospitalizações no SUS são representados por DCV associadas à HA e aumentaram 32%, em reais, de 2010 a 2019, passando de R\$ 1,6 bilhão para R\$ 2,2 bilhões no período. (NILSON et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, um paciente é considerado normotenso quando as medidas de consultórios são menores ou iguais a 120/80 mmHg e as medidas por meio da monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA) ou medição residencial da pressão arterial (MRPA) confirmam esses valores considerados normais

(MALACHIAS, 2016). Considera-se pré-hipertenso o paciente que apresenta pressão arterial sistólica (PAS) entre 121 e 139 e/ou pressão arterial diastólica (PAD) entre 81 e 89 mmHg. O paciente é considerado hipertenso quando os valores de pressão arterial obtidos por diferentes métodos são superiores a 140 mmHg, sendo classificada em três diferentes estágios (MALACHIAS, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a casual ou no consultório.

Classificação	PAS(mmHg)	PAD(mmHg)
Normal	≤ 120	≤ 80
Pré- hipertenso	121 - 139	81 - 89
Hipertensão estagio 1	140 - 159	90 - 99
Hipertensão estagio 2	160 - 179	100 - 109
Hipertensão estagio 3	≥ 180	≥ 110

Fonte: Sociedade Brasileira De Cardiologia, 2016

1.2. Óxido Nítrico (NO) na Hipertensão Arterial

Embora a HAS seja multifatorial, o óxido nítrico (NO) se destaca devido sua relevância fisiológica, principalmente como modulador do tônus vascular. O NO foi descoberto em 1772 pelo pesquisador Joseph Priestly como uma espécie de gás incolor, sendo considerado um poluente ambiental (GOSHI et al., 2019).

Em 1980, Furchgott, de maneira elegante, descobriu que o endotélio vascular é fundamental para o relaxamento dos vasos em resposta à acetilcolina. Furchgott conclui que há um fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) que é liberado quando a acetilcolina atua em seus receptores vasculares e responsável pelo relaxamento das artérias. A partir deste marco histórico, o endotélio vascular considerado como uma simples barreira entre o sangue e as células musculares lisas, passou a ter relevância fisiológica para função vascular. Posteriormente, Ferid Murad observou que substâncias que liberam NO promovem relaxamento vascular. Em 1987, Furchgott e Ignarro et al. demonstraram que o EDRF é o NO (GUNAY; CATRAVAS, 2006). Este conjunto de experimentos resultou a Furchgott, Ignarro e Murad o Prêmio Nobel em 1998 pelos avanços atribuídos a medicina.

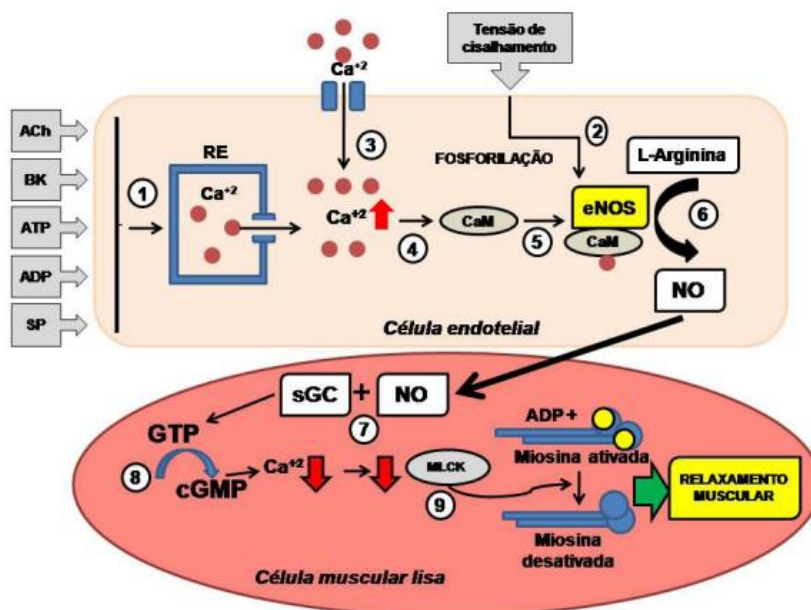
Moncada e cols. mostraram posteriormente que o aminoácido L-arginina é o precursor para a síntese de NO, por meio da NO sintase endotelial (eNOS), uma das três isoformas da enzima (GOSHI et al., 2019).

Desde então, houve um crescimento exponencial de estudos mostrando a importância do NO e seus efeitos em condições fisiológicas e patológicas além do relaxamento vascular como, outros efeitos no sistema cardiovasculares, ação antimicrobiana, cicatrização de feridas, reparação tecidual, sistema imunológico, regulação da pressão arterial, citotoxicidade, entre outros (GOSHI et al., 2019).

O NO modula a homeostase e o tônus vascular de diversas maneiras, como, inibição da proliferação das células do músculo liso, agregação plaquetária, adesão de plaquetas e monócitos ao endotélio, oxidação de LDL, expressão de moléculas de adesão e produção de endotelina. Portanto, quando essas funções estão comprometidas, pode ser sugerido que há biodisponibilidade reduzida de NO (GUNAY, CATRAVAS, 2006).

Atualmente, é conhecido como seu mecanismo de ação ocorre no vaso para promover o relaxamento vascular, via de sinalização amplamente explorada por farmacologistas (Figura 3).

Figura 3. - Produção endotelial de óxido nítrico e sua ação na musculatura lisa vascular. (1) Ativação cálcio-dependente da eNOS a partir de acetilcolina (ACh), bradicinina (BK), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), substância P (SP). (2) Ativação da eNOS a partir de fosforilação mediada por proteínas quinases. (3) Aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} . (4) Ligação entre a proteína calmodulina (CaM) e os íons Ca^{+2} . (5) Ativação da eNOS. (6) Produção de NO a partir de L-arginina. (7) Difusão de NO e interação com a enzima guanilil ciclase solúvel (sGC). (8) Conversão de GTP em cGMP. (9) Redução da concentração de Ca^{+2} e sucessiva redução da ativação enzimática da miosina quinase de cadeia leve (MLCK).



Fonte: Prestes et al., 2016

A função do NO como modulador da pressão arterial é tão significativa que a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) por L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester) é um modelo experimental de hipertensão bem estabelecido e que foi escolhido para utilizarmos neste estudo. O aumento na pressão arterial induzida pela deficiência de NO promove disfunção endotelial, remodelamento do coração e vasos, bem como comprometimento da função renal (AHMAD et al., 2018).

Portanto, a redução de NO participa da fisiopatologia de doenças consideradas como problemas de saúde pública e fatores de risco para doenças cardiovasculares como: obesidade, diabetes e HA. Em muitos casos, a doença cardiovascular (DCV) pode ser prevenida identificando e controlando os fatores de risco modificáveis. Uma possibilidade considerável para manutenção dos fatores de risco em DCV seria melhorar a disfunção endotelial, por exemplo, aumentando a biodisponibilidade de NO por meio de antioxidantes, uma vez que muitos desses fatores estão relacionados à disfunção endotelial (GUNAY; CATRAVAS, 2006).

O aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) interagem com NO formando peroxinitrito (ONOO^-), que é responsável por diminuir a biodisponibilidade de NO e acometem outras substâncias no nosso organismo podendo comprometer a função de enzimas e proteínas chave na fisiologia do sistema cardiovascular.

Em conjunto, ERON diminuem a biodisponibilidade de NO e participam da progressão na lesão em órgão-alvo durante a HA (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004).

ERON são derivados reativos do metabolismo do oxigênio e nitrogênio, em condições fisiológicas, são produzidas de uma maneira controlada e funcionam como moléculas de sinalização que regulam o metabolismo celular. Em condições patológicas há o aumento na geração de ERON, denominado de estresse oxidativo, que ocorre devido ao desequilíbrio entre a ação de enzimas oxidantes e antioxidantes. Neste caso, há aumento da expressão ou atividade de enzimas responsáveis pela formação de ERON e/ou uma diminuição de enzimas responsáveis pela inativação de ERON, sendo responsável pela disfunção endotelial, aumento da contração vascular, hiperplasia, hipertrofia e apoptose das células musculares lisas e aumento da deposição das proteínas da matriz extracelular, sendo os principais processos que contribuem para o dano vascular em doenças cardiovasculares (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). Dentre as ERON mais importantes temos o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($OONO^-$) e radical hidroxil (OH^-). O ânion superóxido é o precursor de outras ERO e sua produção nos vasos é predominantemente catalisada pela enzima NADPH oxidase. A NADPH oxidase quando ativa, produz O_2^- em baixas concentrações de forma lenta e contínua (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). Porém, vários estímulos de relevância para fisiopatologia da HA podem estar associados à ativação da NADPH oxidase (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004). A angiotensina II é considerada um potente ativador de NADPH oxidase, sendo essa enzima sugerida como uma das responsáveis pela hipertensão e alterações cardiovasculares (GRIENGLING et al., 2000). O estresse oxidativo, é considerado um importante fator patogênico em doenças cardiovasculares (NAKMAREONG et al., 2011; DATLA; GRIENGLING, 2010).

1.3. Alterações Cardiovasculares Associadas à HA

1.3.1. Remodelamento Vascular

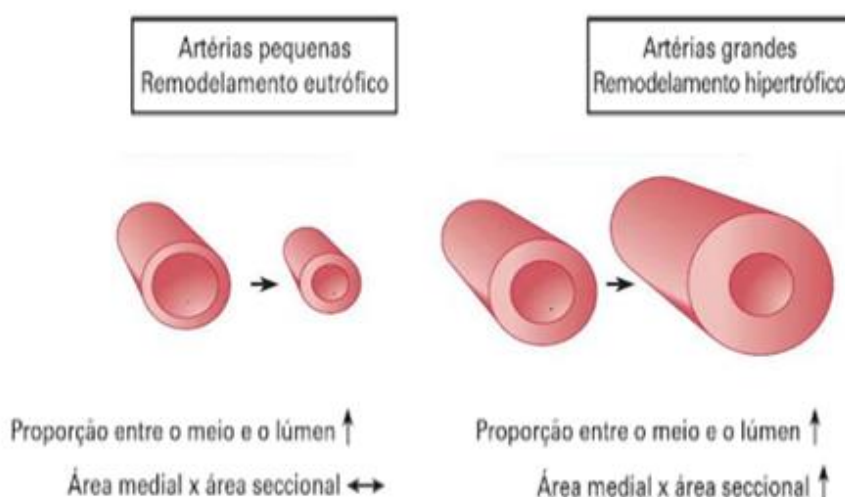
As alterações cardiovasculares associadas à HA não são apenas funcionais, mas também estruturais (CARVALHO et al., 2001). Algumas dessas alterações incluem espessamento da parede (dos vasos e coração) decorrentes da hipertrofia e hiperplasia das células do músculo liso vascular, migração, proliferação e apoptose celular, além de deposição de componentes da matriz extracelular (GUIMARÃES et al., 2010).

Durante a HA essas alterações resultam em importante remodelamento vascular,

promovendo uma resposta adaptativa ao aumento da pressão na parede das artérias. Inicialmente, esse remodelamento vascular é benéfico, pois permite que os vasos se adaptem às alterações de pressão. Porém, um aumento significativo e persistente na pressão arterial contribui para o remodelamento mal adaptativo crônico e disfunção vascular, o que induz alterações na matriz extracelular e modificações no fenótipo das células do músculo liso vascular (CMLV) (BELO et al., 2015).

Em estágios iniciais ou moderados da hipertensão, as CMLV se rearranjam em torno do lúmen do vaso e a hipertrofia de células é observada. Existem tipos distintos de remodelamento vascular descrito para artérias de resistência e de grande calibre, como a aorta. O remodelamento eutrófico ocorre em artérias de resistência, e é caracterizado por uma diminuição no diâmetro do lúmen, com pouca ou nenhuma mudança na espessura da parede vascular como observado na figura 4. Já o remodelamento hipertrófico, ocorre principalmente nas grandes artérias ou artérias de condução, tais como a aorta, e leva a um aumento significativo na espessura da parede vascular, com hipertrofia das CMLV, e acúmulo de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e elastina (Figura 4) (KAPLAN et al., 2015)

Figura 4: Remodelamento vascular de pequenas e grandes artérias na hipertensão.

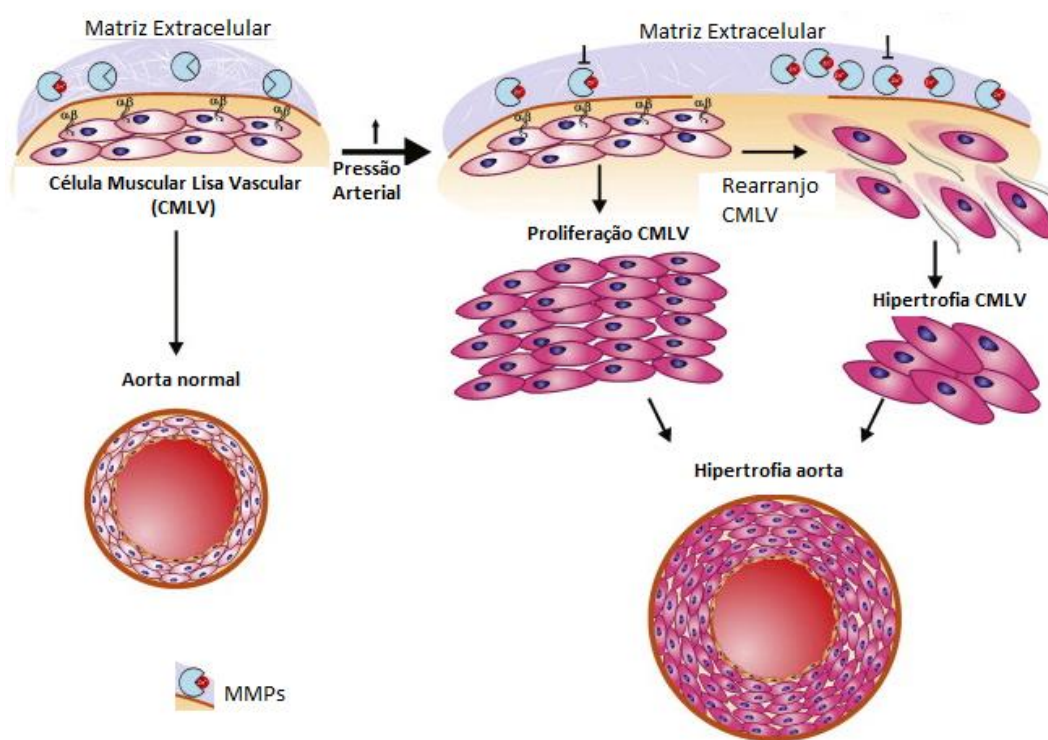


Fonte: Modificado de KAPLAN et al., 2015

A degradação e reorganização da matriz extracelular na parede do vaso promove o remodelamento (RAJZER et al., 2017). O aumento da tensão na parede do vaso ativa

proteínas que degradam a matriz extracelular e facilitam a migração e proliferação de novas células no processo denominado de hiperplasia. Além disso, a degradação da matriz extracelular também contribui para o aumento no tamanho das CMLV já existentes, denominando o processo chamado de hipertrofia. Os processos de hipertrofia e hiperplasia das CMLV em conjunto resultam na hipertrofia da parede da artéria, como pode ser observado na Figura 5 (CASTRO et al., 2011).

Figura 5 - Processo de remodelamento vascular que pode ocorrer durante a progressão da HA em vasos de grande calibre, como a aorta.



Fonte: Modificado de CASTRO; TANUS-SANTOS;GERLACH, 2011

Verifica-se que as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) estão presentes em menor concentração nos vasos antes do aumento da PA e em forma de zimogênio (sua forma inativa). O aumento da PA promove a ativação e maior expressão proteica das MMP e a degradação da matriz extracelular é um dos fatores que contribuem para a proliferação e hipertrofia das CMLV.

1.3.2. Remodelamento Cardíaco

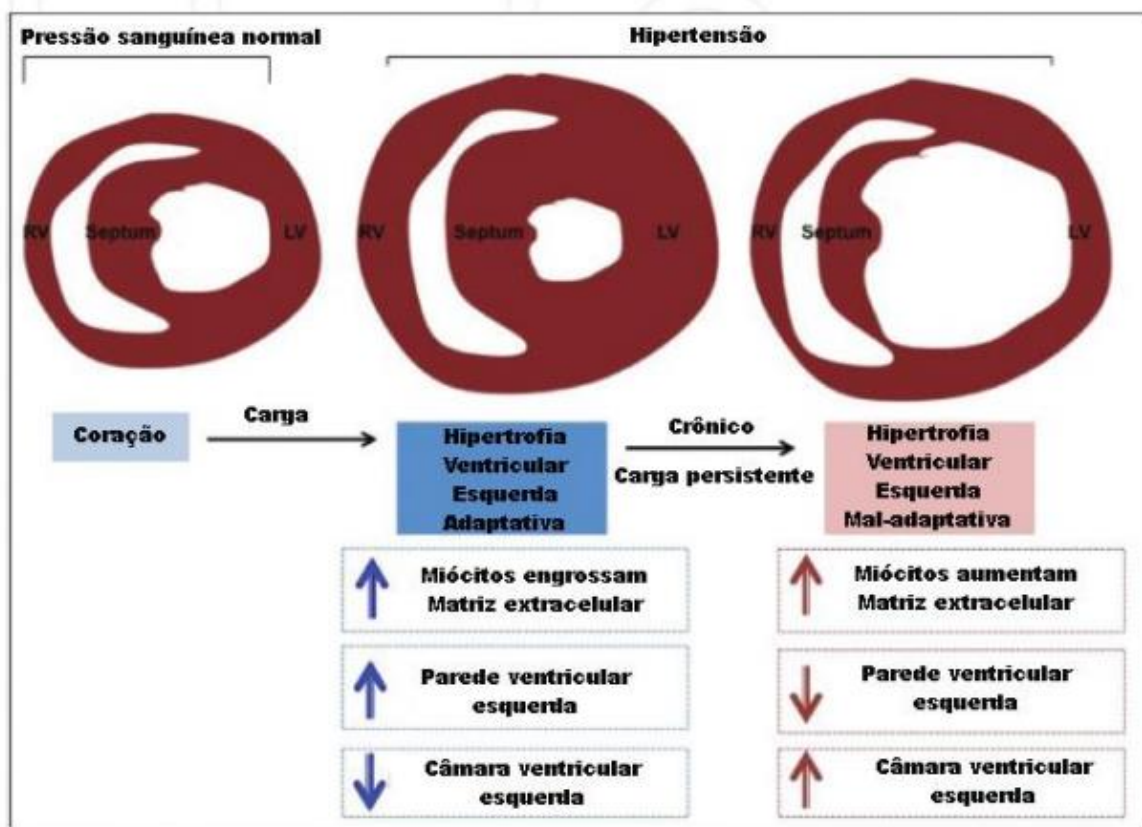
Semelhante às alterações encontradas nos vasos a HAS promove remodelamento cardíaco no intuito de normalizar o aumento da tensão na parede do ventrículo esquerdo. Esse remodelamento é uma resposta morfológica adaptativa compensatória, denominada hipertrofia ventricular esquerda (HVE), e se caracteriza pelo aumento da massa do coração devido ao aumento do volume dos miócitos (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007; LEVY; LARSON; VASAN; KANNEL et al., 1996; LORELL; CARABELLO, 2000).

Essas alterações estruturais podem ser provenientes de unidades contráteis de proteínas nos cardiomiócitos, levando a um aumento na largura do miócito, e hipertrofia da matriz extracelular cardíaca (MEC). Sendo, a rotatividade intensiva da ME uma importante característica da hipertensão, o que leva a uma maior deposição de colágeno (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007). No início a hipertrofia adaptativa ocorre no ventrículo esquerdo que cresce para dentro, o que resulta na redução da câmara do ventrículo esquerdo (RESTINI; GARCIA; NATALIN; NATALIN et al., 2017).

Como consequência a essa hipertrofia ocorre uma disfunção sistólica e diastólica e apesar de adaptativa e compensatória na maioria dos casos pode se tornar descompensada e mal adaptativa (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007), como é possível observar na figura 6 e 7, onde a câmara ventricular esquerda é dilatada, o ventrículo esquerdo é reduzido, assim como a parede do septo, levando a uma menor força de contração pela perda de proteínas contráteis (RESTINI; GARCIA; NATALIN; NATALIN et al., 2017; ROSSI, 1998; ROSSI; CARILLO, 1991).

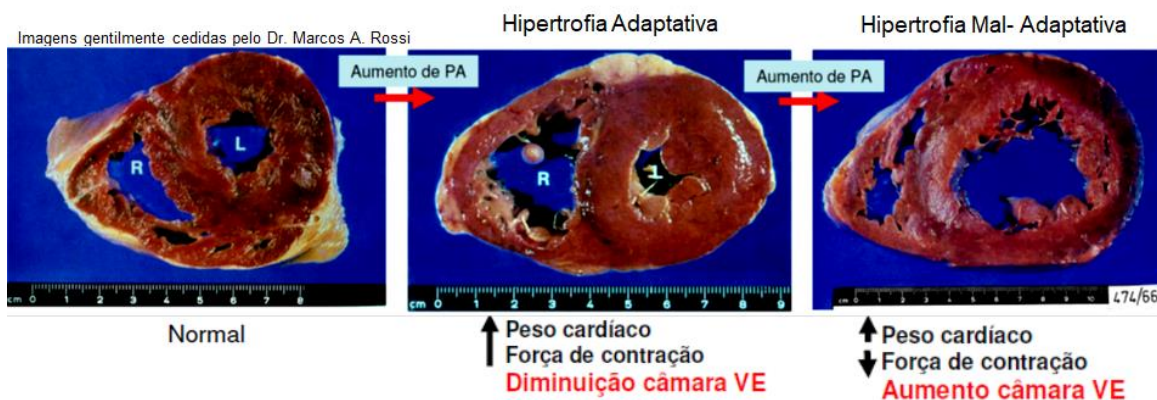
Essa hipertrofia intensa leva a diminuição da contratilidade cardíaca, reduzindo a capacidade do coração de bombear o sangue (OPIE; COMMERFORD; GERSH; PFEFFER, 2006). Alguns estudos mostram que a fibrose cardíaca pode colaborar para a disfunção diastólica inicial, prejudicando o prolongamento dos miócitos durante a diástole (LEVY; LARSON; VASAN; KANNEL et al., 1996; OPIE; COMMERFORD; GERSH; PFEFFER, 2006; ROSSI, 1998). Esses fatores podem contribuir para a diminuição da sobrevida de muitos pacientes.

Figura 6: A hipertensão induziu progressão da hipertrofia adaptativa para a hipertrofia mal adaptativa.



Fonte: modificado de RESTINI; GARCIA; NATALIN; NATALIN et al., 2017

Figura 7: Característica morfológica do remodelamento cardíaco decorrente da hipertensão arterial crônica.



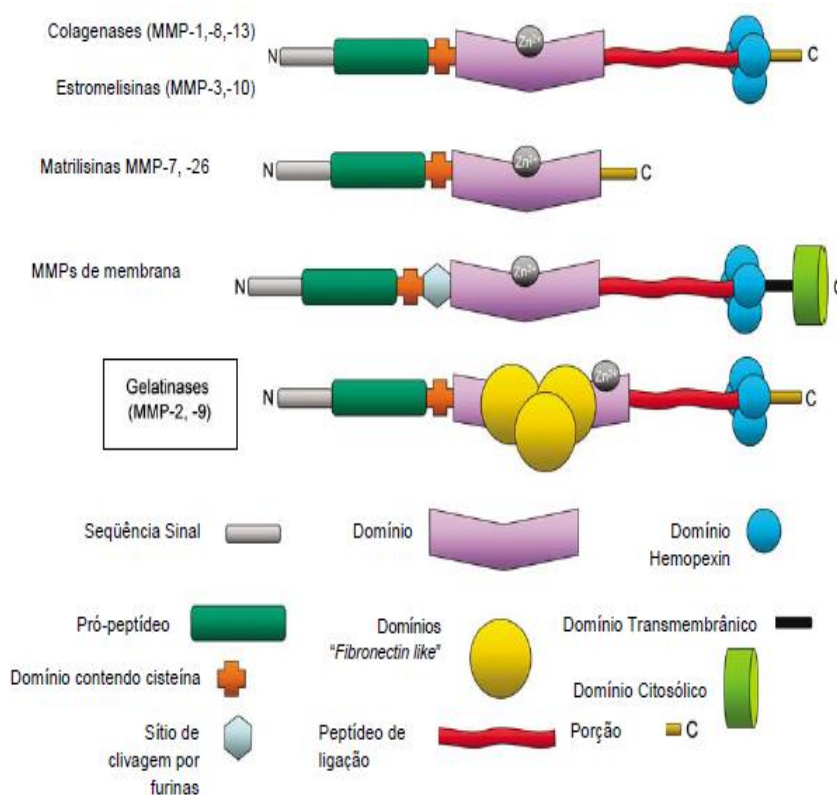
Fonte: RIZZI; GERLACH, 2010

1.4. Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs)

Muitas são as enzimas responsáveis pela degradação de produtos existentes na matriz extracelular, sendo as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) descritas como as principais envolvidas no remodelamento vascular durante a HAS (WANG et al.,2017).

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de cálcio e que contem zinco (Zn^{2+}). Desempenham um importante papel no remodelamento tecidual fisiológico que ocorre durante o crescimento, a gravidez e exercício físico, dentre outros. São classificadas em 28 tipos, de acordo com a especificidade do substrato em collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP -11), matrilisinases (MMP-7 e MMP-26), MMP de tipo membrana (MMP-14-17, MMP-24 e MMP-25) e outras (MMP-12, MMP-19-21, MMP23, MMP-27 e MMP-28) (BELO et al., 2015).

Figura 8. Principais MMPs e suas características estruturais. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 se diferem das demais, apresentando três domínios “*fibronectin-like*”



Fonte: Modificado de CHOW, CENA et al. 2007.

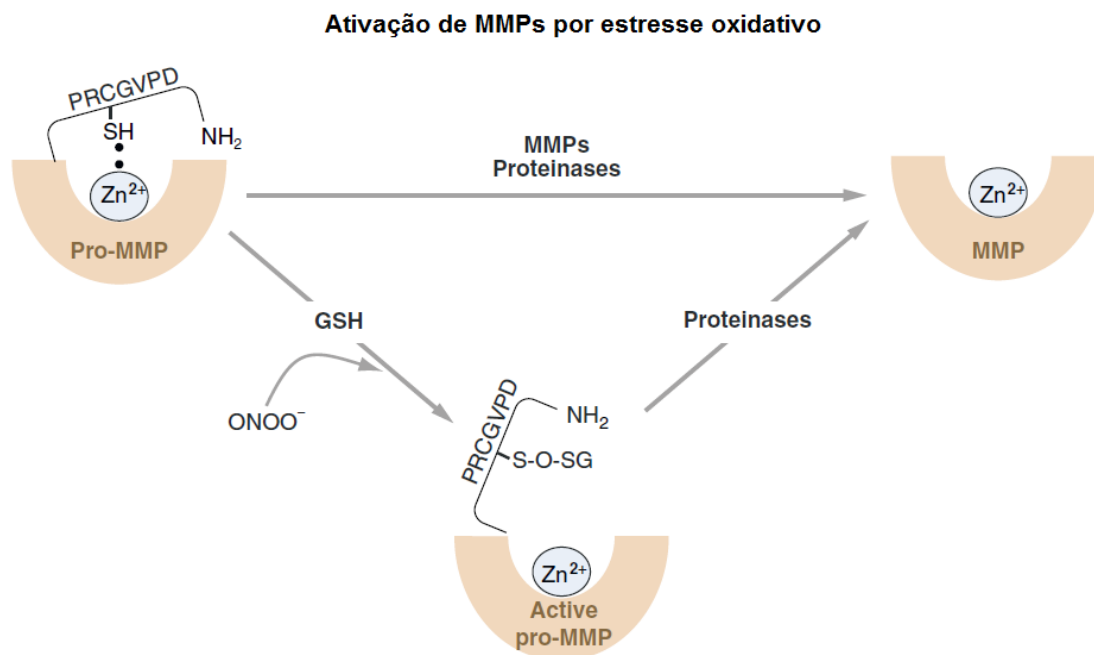
A atividade aumentada das MMPs contribui para o desenvolvimento de diversas patologias, desempenhando importante papel nas doenças cardiovasculares como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença cardíaca isquêmica, aneurisma vascular e hipertensão (GUIMARÃES et al., 2011).

Dentre as MMPs, destacamos a MMP-2 ou gelatinase A, que é encontrada em quase todos os tipos de células, inclusive nos vasos (endotélio e CMLV) e no coração. Nos cardiomiócitos, a MMP-2 é expressa não somente na matriz extracelular, mas também no interior destas células e no núcleo (SCHULZ, 2007). A MMP-2 é amplamente conhecida por contribuir para doenças cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio e HAS (RIZZI et al., 2009 ; CASTRO et al., 2009). O aumento de MMP em pacientes hipertensos está diretamente relacionado à rigidez da parede vascular arterial, sendo revertida pela terapia farmacológica anti-hipertensiva (RAJZER et al., 2017). A tensão aumentada na parede do vaso contribui para a ativação da MMP-2 que está relacionada as alterações morfofuncionais presentes na HAS (CASTRO et al., 2008 ; CHEN et al., 2013 ; CAU et al., 2015; RIZZI et al., 2013). Animais hipertensos renais apresentaram aumento na atividade de MMP-2 vascular um mês após a cirurgia. Os mesmos animais hipertensos foram tratados com inibidor de MMP-2 por seis semanas e foi observado que o remodelamento hipertrófico que ocorre na aorta de animais hipertensos renais foi revertido após a inibição da MMP-2 (GUIMARAES et al., 2011). Estudos posteriores também sugerem que a inibição da MMP-2 melhora as alterações cardiovasculares em modelos experimentais de hipertensão (CAU et al. 2015).

Além do remodelamento vascular, a função endotelial também foi reestabelecida em animais hipertensos tratados com inibidor de MMP (CASTRO et al., 2008; GUIMARAES et al., 2011). Embora o aumento na PA seja um fator importante descrito para a ativação da MMP-2, foi mostrado que somente a redução na PA pode não ser suficiente para inibir a ativação desta protease (GUIMARAES et al., 2010), o que sugere a participação de outras vias de sinalização intracelular que ativa a MMP-2 durante a HAS.

A atividade das MMPs, especialmente a MMP-2, pode ser controlada por mecanismos de regulação da expressão gênica, mas também por mecanismos pós-traducionais como, por exemplo, ERON observado na Figura 9 (SCHULZ, 2007).

Figura 9: Esquema ilustrativo da ativação de MMPs por ERON.



Fonte: Modificado de SCHULZ, 2007.

A ativação da MMP-2 está representada por duas maneiras diferentes: (1) a remoção do domínio auto inibitório do zimogênio da forma de 72 kDa por outras proteinases resulta na forma ativa de 64 kDa e (2) por meio de modificação pós-traducional como, por exemplo, o estresse oxidativo representado pelo peroxinitrito, que promove a instabilidade na interação entre o resíduo de cisteína com o domínio altamente conservado e presente no pró-peptídeo inibitório de todas as MMPs. Na segunda maneira descrita, via estresse oxidativo, é possível observar que o sítio catalítico da MMP-2 é exposto e ela pode degradar seus substratos mesmo na presença do pró-peptídeo, ou seja, na forma de 72 kDa. Dessa maneira, a MMP-2 na forma de 72 kDa que antigamente era chamada de forma inativa, na presença de estresse oxidativo, fica ativa mesmo com esse peso molecular. Posteriormente, a MMP-2 pode sofrer ação de outras proteases e libera o domínio do pró-peptídeo ficando na forma de 64 kDa.

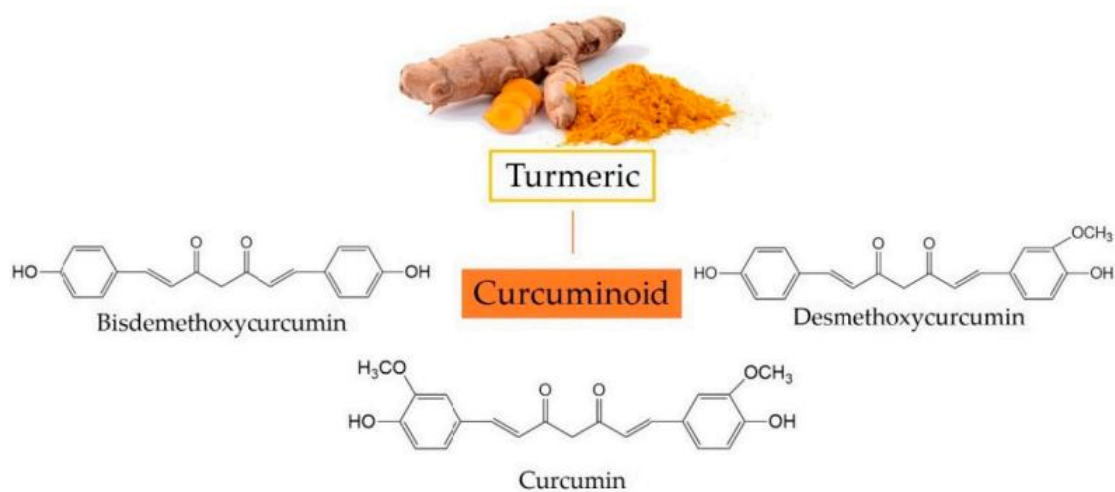
Diversos estudos mostram que drogas antioxidantes são eficazes por reduzirem o estresse oxidativo gerado pela hipertensão arterial e diminuem a atividade das MMPs e consequentemente, atenua o remodelamento cardiovascular (CASTRO et al., 2009; RIZZI et al., 2013; LIN et al., 2016; CERON et al., 2010). Portanto, a redução na atividade da MMP-2 pode ser um dos mecanismos benéficos associados a fármacos com atividade antioxidante.

1.5. Curcumina

A curcumina (CUR) é um composto fenólico isolado da *Curcuma longa* Linn (Zingiberaceae), uma árvore perene que cresce em regiões tropicais da Ásia (NAKMAREONG et al., 2011). É um pigmento amarelo muito utilizado na culinária, conhecido popularmente como açafrão ou açafrão da terra. Vários estudos têm evidenciado os efeitos benéficos da curcumina, incluindo antiinflamatório, antioxidante, anti-hipertensivo, antiviral, propriedades anti-infecciosas, anticâncer e cicatrizantes (KARIMIAN et al., 2017).

O extrato em pó do rizoma da Cúrcuma é composto por três importantes curcuminóides: curcumina (60 a 70%), desmetoxicurcumina (20 a 27%) e bisdemetoxicurcumina (10 a 15%) (Figura 10).

Figura 10: Principais curcuminóides da cúrcuma e suas estruturas químicas



Fonte: XU X-Y et al., 2018.

Apesar dos benefícios atribuídos ao tratamento com curcumina, este composto fenólico apresenta baixa biodisponibilidade e a alta susceptibilidade ao metabolismo no trato gastrointestinal, os estudos buscam por alternativas para viabilizar seu uso com menor concentração utilizando nanopartículas ou lipossomas ou modificação estrutura (ANAND et al., 2007; JAMWAL, 2018). Porém, mesmo com baixa biodisponibilidade alguns estudos experimentais mostram que a curcumina apresenta efeitos favoráveis na HA que ainda não

foram associados à redução no remodelamento vascular e MMP-2 (NAKMAREONG et al., 2011).

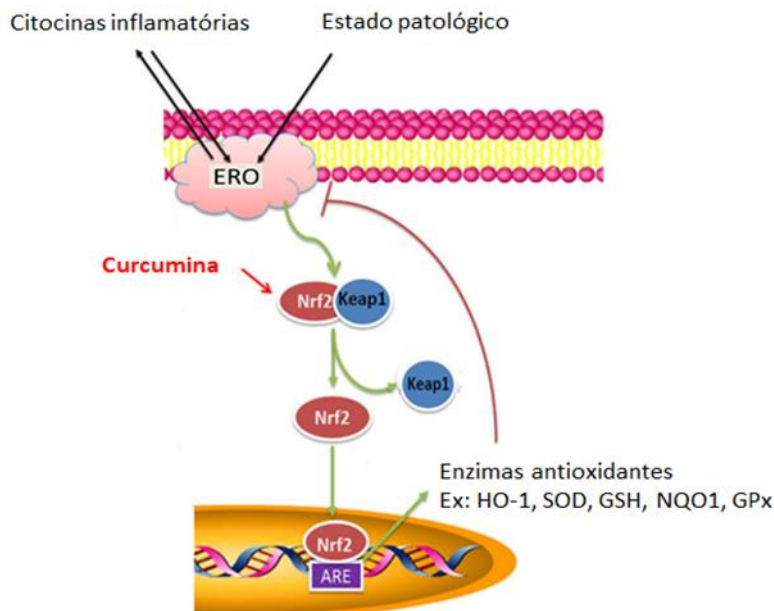
Estudos clínicos mostram que a suplementação com curcumina por longo período (\geq 12 semanas) mesmo apresentando redução discreta na PA (2mmHg) diminuiu a mortalidade por doença isquêmica do coração e acidente vascular cerebral em 7% e 10%, respectivamente, sugerindo que a curcumina tem o potencial para impactar as consequências cardiovasculares. No entanto, mais estudos, especialmente em pacientes com hipertensão e com maior duração de acompanhamento, são necessários para confirmar os resultados e propor a curcumina como um tratamento complementar da hipertensão na prática clínica (HADI et al., 2019).

Os mecanismos associados com a ação antioxidante da Curcumina foram descritos e parecem envolver o aumento na expressão de enzimas antioxidantes pela ativação da via Nrf2 e keap1, que são responsáveis por aumentar a transcrição gênica de enzimas como superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH) dentre outras.

O Nrf2 atua como regulador da resistência celular aos oxidantes. Nrf2 controla a expressão basal e induzida de uma série de genes dependentes de uma sequência de DNA conhecida como elementos de resposta antioxidante (ARE) para regular condições fisiológicas e fisiopatológicas mediante exposição aos oxidantes (QIANG, 2013).

Sob condições fisiológicas, o Nrf2 está localizado no citoplasma ligado a proteína Keap1. No entanto, em condições de estresse oxidativo a Keap1 atua como um sensor molecular e sofre modificações químicas, sendo liberada, e então o Nrf2 entra no núcleo. O papel da curcumina como um antioxidante também pode ser atribuído a sua capacidade de reforçar a ação da Nrf2 quando dentro do núcleo, protegendo assim a célula da lesão, pois Nrf2 irá liberar enzimas antioxidantes, e inibir a formação de ERO, como observado na figura 11 (LI et al., 2019).

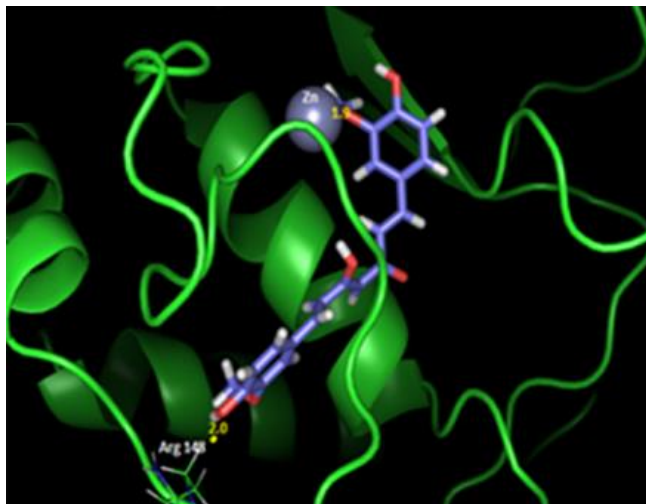
Figura 11: Esquema ilustrativo da cascata de sinalização intracelular ativada pelo aumento proteico de enzimas antioxidantes



Fonte: Modificado de LI et al., 2019.

Os efeitos da curcumina sobre a atividade da MMP-2 já foram avaliados em diferentes modelos experimentais de hipertensão (BOONLA et al; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014). Inclusive, estudos de docking molecular demonstraram que a curcumina possui sítios de interação com a MMP-2, que podem afetar diretamente a atividade da MMP-2 (Figura 12) (AHMAD et al., 2015). O sítio ativo dessa protease possui aminoácidos vinculados ao zinco (Zn). O estudo sugere que o grupamento hidroxila da curcumina interage com um desses aminoácidos, enquanto o grupamento metoxila interage com o Zn e essa ligação influencia em sua atividade (AHMAD et al., 2015). Porém, ainda é incerto se a inibição da MMP-2 é um dos mecanismos benéficos relacionados com o tratamento com Curcumina.

Figura 12: Ligação de curcumina no sítio ativo da proteína MMP-2 conforme avaliado por docking molecular.



Fonte: AHMAD et al., 2015

2. HIPÓTESE

Curcumina previne o aumento da pressão arterial, reduz estresse oxidativo, a atividade das MMPs e atenua o remodelamento cardiovascular na hipertensão induzida por L-NAME.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos da curcumina sobre a hipertensão arterial, remodelamento cardiovascular, estresse oxidativo e atividade da metaloproteinase da matriz extracelular (MMP-2) na aorta e coração de ratos hipertensos.

3.2. Específicos

Avaliar os efeitos da curcumina nas doses de 50 mg e 100 mg sobre:

- A pressão arterial e peso em animais controles e hipertensos após administração de L-NAME;
- Remodelamento cardiovascular;
- Expressão e atividade da MMP-2 na aorta e coração dos animais;
- Estresse oxidativo pela técnica de detecção da peroxidação lipídica no plasma;

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de curcumina sobre a atividade da MMP-2 de maneira direta na aorta e coração dos animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Considerações Gerais

Foram utilizados ratos machos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério fornecidos pelo Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda (Paulínia, SP) e mantidos no Laboratório Experimental Animal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Os animais foram mantidos em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), e livre acesso a ração e água. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética animal da UNAERP (n° 13/2017)

4.2. Hipertensão Arterial induzida pela técnica L-NAME

O modelo experimental utilizado foi por inibição de formação de NO, utilizando o composto L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester). O NO, importante vasodilatador, fornece proteção cardiovascular, evitando o aumento da pressão sanguínea. A administração crônica de L-NAME promove hipertensão acentuada e danos em órgãos-alvo por inibir a atividade da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), reduzindo a produção de NO (SIMKO et al., 2018). Este modelo apresenta aumento de estresse oxidativo e MMP-2 que podem contribuir para as alterações cardiovasculares encontradas em aortas e coração de ratos após o tratamento com L-NAME. Os animais do grupo L-NAME receberam a dose de 70 mg/kg/dia administrada por gavagem e os animais do grupo controle receberam água também por gavagem, durante duas semanas.

Os animais foram randomizados em 5 grupos com 10 animais cada:

- A) Controle + veículo (Carboximetilcelulose – Sigma-Aldrich);
- B) L-NAME + veículo
- C) Controle + CUR 100 mg/Kg/dia
- D) L- NAME + CUR 50 mg/Kg/dia
- E) L- NAME + CUR 100 mg/Kg/dia

O tratamento foi administrado por gavagem durante duas semanas (RIADO et al., 1999). Da seguinte forma:

- O grupo A recebeu água e veículo;
- O grupo B recebeu L-NAME e veículo;

O grupo C recebeu água e curcumina 100 mg/Kg/dia

E os grupos D e E receberam L-NAME e curcumina nas doses descritas acima.

A curcumina foi gentilmente cedida pela Farmácia Universitária Cidinha Bonini, proveniente da Akron Pharma Indústria.

4.3. Avaliação da Pressão Arterial

Para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a hipertensão, a pressão arterial sistólica foi verificada semanalmente por pletismografia de cauda durante as duas semanas do estudo. Os animais são alocados em tubos de contenção e o manguito e um transdutor colocados na cauda do animal. O transdutor é acoplado a um computador para as medidas de pressão. Foram realizadas treze medidas consecutivas, sendo as três primeiras descartadas. As medidas foram analisadas e as médias foram utilizadas para a análise estatística.

4.4. Avaliação de peso

Para avaliação do peso dos animais, foi utilizada uma balança. Os animais foram pesados durante as duas semanas e os pesos anotados em uma planilha, para no final a comparação entre os grupos.

4.5. Remodelamento Cardiovascular

Para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre o remodelamento cardiovascular a aorta e coração foram retirados dos animais e fragmentos transversos foram colocados em formol por 24 horas. Após esse período, o formol foi trocado por álcool 70%. Os tecidos foram emblocados em parafina e cortados com 4 μ m de espessura. A coloração que foi utilizada para a análise morfométrica foi a hematoxilina e eosina. Para aorta, a área de secção transversal (AST) e razão média/lúmen (M/L) foram avaliadas utilizando as imagens fotografadas em 50 X em microscópio acoplado a uma câmera. Todos estes parâmetros foram calculados usando o programa ImageJ (NIH). Para o coração, a espessura do septo intraventricular e ventrículo esquerdo foram avaliadas por meio do programa ImageJ e o diâmetro do miócito foi avaliado pelo microscópio Leica. Para cada animal, 20 cardiomiócitos foram mensurados e a média das medidas foi utilizada como valor médio do miócito.

4.6. Determinação da expressão de MMP-2 na aorta e coração por zimografia em gel

Para determinar se a curcumina 50 mg/Kg/dia e 100 mg/Kg/dia podem diminuir a atividade e expressão da MMP-2, essa metodologia foi utilizada como avaliação da expressão da MMP-2 na aorta dos animais. A quantidade de MMP-2 na aorta e coração dos animais foi determinada por meio da técnica de zimografia. As amostras dos tecidos foram trituradas, pesadas e colocadas em microtubos para centrifuga, onde foram adicionados 300 µL de tampão de extração (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L 1,10- fenantrolina, 1 mmol/L fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), 1 mmol/L N-etilmaleimida (NEM), e 10 mmol/L CaCl₂) para cada 0,03 g de tecido, então foram congeladas. No dia seguinte foram centrifugadas (14.000 RPM, 15 minutos). O sobrenadante foi recolhido para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford, que consiste em um ensaio colorimétrico quantitativo, em que ao se ligar às proteínas do tecido o reagente adquire uma coloração azul, utilizados uma placa de Elisa contendo 5 uL de branco, dos 5 pontos da curva e de amostras e logo em seguida 250 uL de Bradford em cada poço da placa. O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteína para cada amostra analisada. A coloração azul desenvolvida no contato com as proteínas foi quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra.

Suas absorbâncias foram medidas através de um aparelho de espectrofotômetro e calculadas a partir de um volume que contém 10 ug de proteínas.

Posteriormente as amostras foram diluídas no tampão (1:1, SDS 2%, Tris- HCl 125mM, glicerol 10% e azul de bromofenol) para a aplicação no gel de eletroforese contendo gelatina 1%. Após preparadas, as amostras foram separadas por meio de eletroforese, em um sistema descontínuo de tampões, utilizando géis de poliacrilamida na concentração de 12%, para cada gel, foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino a 2%),

Por ele foi possível normalizar as eventuais variações nas bandas decorrentes de diferenças na intensidade de coloração dos géis.

Essa normalização é necessária para que pudesse comparar resultados obtidos em diferentes géis.

Após eletroforese, esses géis foram submetidos a 2 banhos de Triton X-100, para remover o SDS e colocados em tampão de ativação (Tris-HCl contendo 50 mM cálcio), por 18 horas. Posteriormente, foram corados com solução Coomassie Blue. Com auxílio do

programa ImageJ, as bandas encontradas nos géis referentes à MMP-2 foram quantificadas. As formas latentes e ativas da MMP-2 foram identificadas por meio dos pesos moleculares: 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa, respectivamente.

4.7. Avaliação da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com malonaldeído (MDA), obtendo esse como produto final da reação, há presença de coloração magenta que é lida por espectrofotometria (532 nm). Em tubos de ensaio, a mistura da reação contendo 100 µL de água destilada, 50 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%), 100 µL de água destilada, 100 µL plasma, 375 µL de ácido acético (20%) e 375 µL de TBA (0,8%) foi incubada em banho-maria a 95°C por 1 hora. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (4000 rpm por 10 min) e o sobrenadante recolhido e colocado em placas para leitura no espectrofotômetro. A curva padrão foi feita de maneira similar, contendo 25 µL de concentrações conhecidas de MDA. A concentração de TBARS no plasma foi calculada de acordo com a curva padrão e expressa em nmol/L.

4.8. Determinações da atividade da MMP-2 *in vitro*

A zimografia foi realizada com as proteínas extraídas da aorta e coração de ratos hipertensos, mas no processo de ativação das MMPs já separadas pela eletroforese, as enzimas foram renaturadas em solução contendo Triton e ativadas na presença de crescentes concentrações de curcumina (0, 15 e 30 µM). A concentração 0 de curcumina contém somente o veículo. Antes de incubar os géis com tampão de ativação, o gel foi cortado em 3 partes que continham as mesmas amostras. Cada parte do gel foi incubado em diferentes recipientes, com solução de ativação acrescida de veículo, curcumina 15 µM e curcumina 30 µM. Os géis foram corados, descorados e fotografados. A intensidade das bandas foi quantificadas com o programa ImageJ.

4.9. Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados com ANOVA (análise de variância) de dois fatores, ANOVA de um fator e teste Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism. Foram considerados estatisticamente diferentes valores com $p < 0,05$. Os gráficos foram representados com média \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS

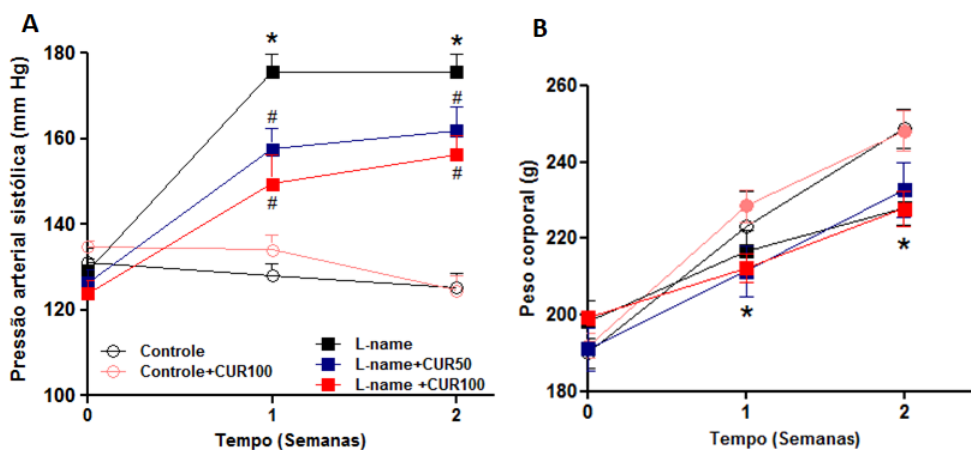
5.1 Efeitos do tratamento com curcumina na pressão arterial e peso corporal dos animais

A pressão arterial sistólica (PAS) e peso corporal dos animais foram avaliados semanalmente como pode ser observado na Figura 13. Na primeira semana do estudo os animais do grupo L-NAME apresentaram um aumento significativo na PAS quando comparado com os animais controle ($p < 0,05$; Figura 13A) e se manteve elevado até o final do estudo. Porém, os animais tratados com curcumina diminuíram significativamente o aumento induzido pelo L-NAME ($p < 0,05$; Figura 13A). Embora a curcumina na dose de 100 mg/kg mostrou um aumento na PAS inferior quando comparado à dose de 50mg/kg, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os animais controles tratados com veículo ou curcumina em relação à PAS ($p > 0,05$). O presente estudo mostrou que o tratamento com curcumina independente da dose, preveniu o aumento da PAS.

Na avaliação do peso corporal dos animais, o grupo controle apresentou ganho de peso superior em relação aos animais do grupo L-NAME ($p < 0,05$; Figura 13B), os quais apresentaram uma redução de peso. Porém, os tratamentos com curcumina nas duas doses não afetaram o peso corporal dos animais, mostrando que a redução do peso corporal do grupo L-NAME está associada à doença e não ao tratamento com o fenólico.

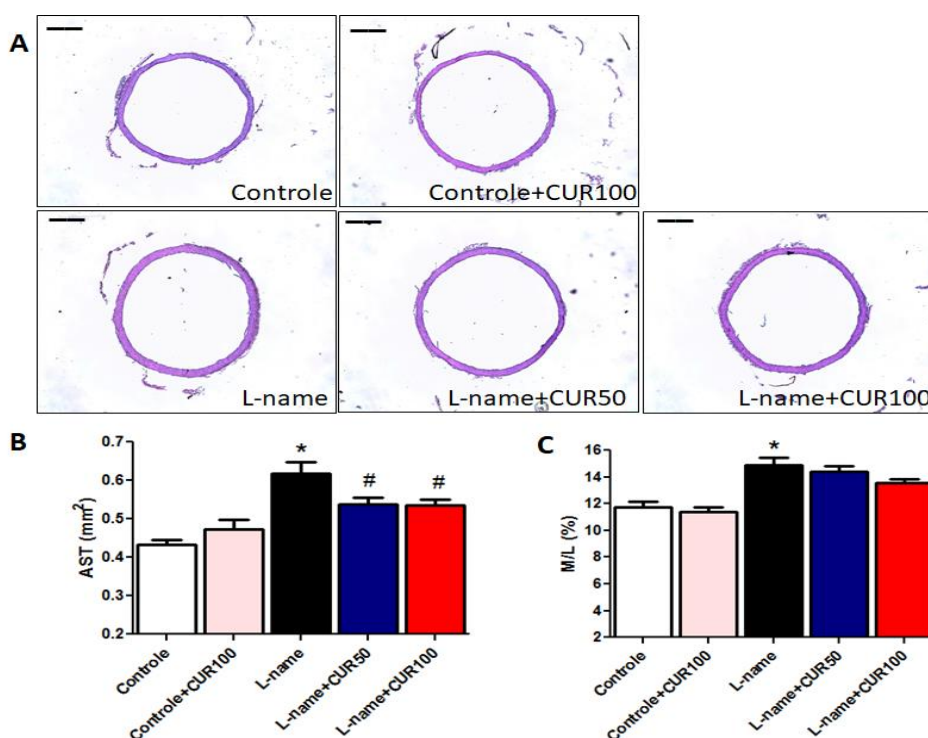
Figura 13. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a pressão arterial sistólica (A) e peso corporal (B). Valores expressos como média \pm EPM. N= 8-10/grupo. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs L-NAME



5.2 Efeitos do tratamento com curcumina no remodelamento vascular

Para avaliar os efeitos da curcumina sobre o remodelamento vascular, cortes histológicos foram utilizados para as análises de morfometria das aortas. Na Figura 14A observam-se microfotografias de cortes de aorta representando os cinco grupos experimentais do presente estudo. Como mostrado na Figura 14B, a AST foi aumentada nos animais hipertensos ($p < 0,05$ vs grupo controle). Como consequência do aumento na área da camada média (AST), foi observado aumento na razão M/L nos animais do grupo L-NAME ($p < 0,05$ vs controle; Figura 14C). Os tratamentos com curcumina nas duas doses avaliadas reduziram semelhante a AST nos animais hipertensos ($p < 0,05$ vs L-NAME veículo; Figura 14B), mas não afetaram a razão M/L de maneira significativa ($p > 0,05$ vs L-NAME veículo; Figura 14C). Portanto, os efeitos benéficos na hipertrofia vascular associados aos tratamentos com curcumina foram independentes da dose.

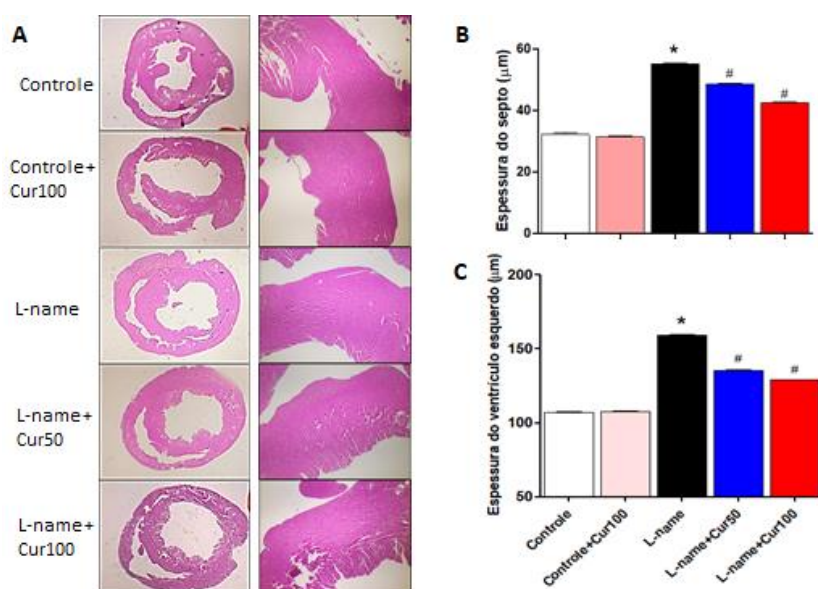
Figura 14. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre o remodelamento vascular. (A) Fotomicrografias representativas de aorta (X25, microscopia óptica convencional, barra = 200 μm). (B) Área de seção transversal (AST) e (C) Razão Média/ Lúmen. Valores expressos como média \pm EPM. N= 6-9/grupo. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs L-NAME.



5.3 Efeitos do tratamento com curcumina no remodelamento cardíaco

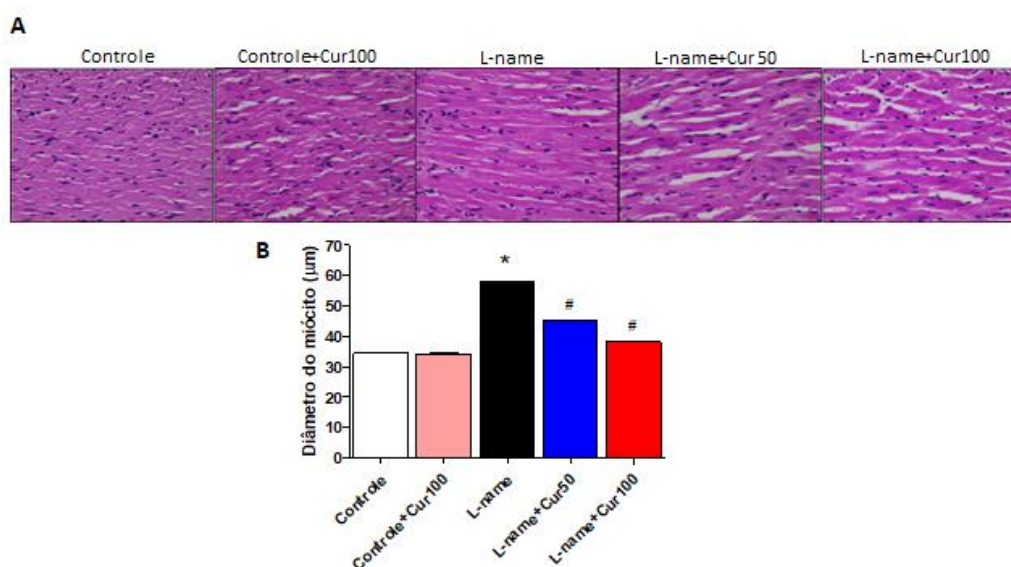
Para avaliar os efeitos da curcumina sobre o remodelamento cardíaco, cortes histológicos foram utilizados para as análises de morfometria do septo, ventrículo esquerdo e das células do coração (miócito). Na Figura 15 observa-se painel representativo de microfotografias de cortes de coração com os cinco grupos experimentais do presente estudo. Como mostrado na Figura 15, a espessura do septo (Figura 15B) e espessura do ventrículo esquerdo (15C) foi aumentada nos animais hipertensos ($p < 0,05$ vs grupo controle). Os tratamentos com curcumina nas duas doses avaliadas reduziram semelhantemente o remodelamento cardíaco observado nos animais hipertensos ($p < 0,05$ vs L-NAME veículo; Figura 15B e 15C).

Figura 15. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre o remodelamento cardíaco. (A) Fotomicrografias representativas de coração (10X e 25X; microscopia óptica convencional). (B) Espessura do septo intraventricular cardíaco e (C) Espessura do ventrículo esquerdo. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10/grupo. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs L-NAME.



Na figura 16 é possível observar que a hipertrofia no ventrículo esquerdo e septo intraventricular encontrada nos animais hipertensos são decorrentes do aumento no tamanho dos cardiomiócitos (Figura 16A e 16B; $P < 0,05$ vs controle). Como esperado devido aos resultados supracitados, os tratamentos com curcumina reduziram significativamente a hipertrofia nos cardiomiócitos nos animais hipertensos independente da dose (Figura 16B, $P < 0,05$ vs L-name). Portanto, os efeitos benéficos na hipertrofia cardiovascular associados aos tratamentos com curcumina foram independentes da dose.

Figura 16. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a hipertrofia dos cardiomiócitos. (A) Fotomicrografias representativas de coração (400X; microscopia óptica convencional). (B) Quantificação do diâmetro do miócito cardíaco. Valores expressos como média \pm EPM. N= 10/grupo. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs L-NAME.

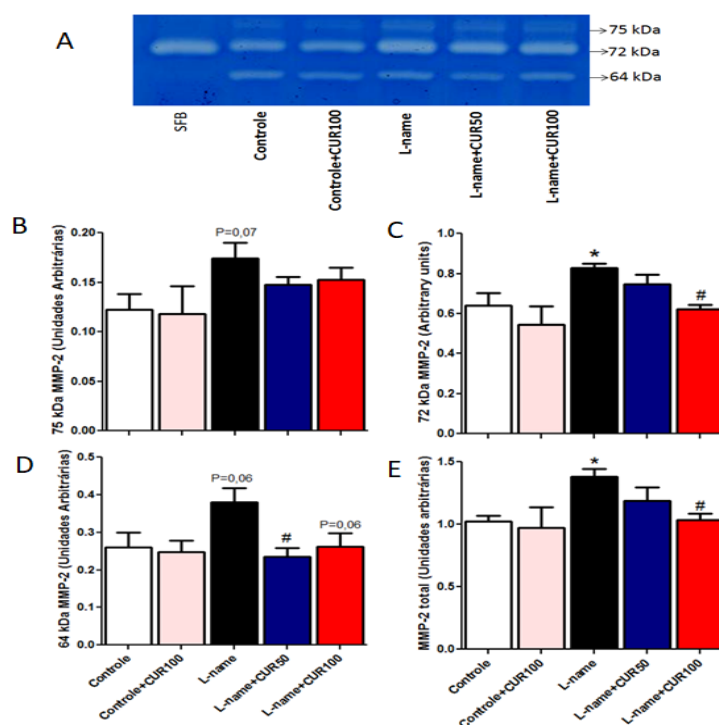


5.4 Efeitos do tratamento com curcumina na expressão das MMPs

Na Figura 17A é possível observar um zimograma representativo mostrando que as bandas de 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa foram encontradas no gel contendo gelatina. Os painéis B, C, D e E da figura 15 mostram os gráficos obtidos pela quantificação das bandas encontradas de 75 kDa, 72 kDa e 64 kDa e a soma total de todas as bandas (MMP-2 total = 75+72+64 kDa), respectivamente. Observa-se que houve aumento da atividade da MMP-2 na aorta dos animais do grupo L-NAME quando comparado com os animais controle ($p < 0,05$), principalmente nas bandas de 72 kDa e MMP-2 total, e este aumento foi atenuado

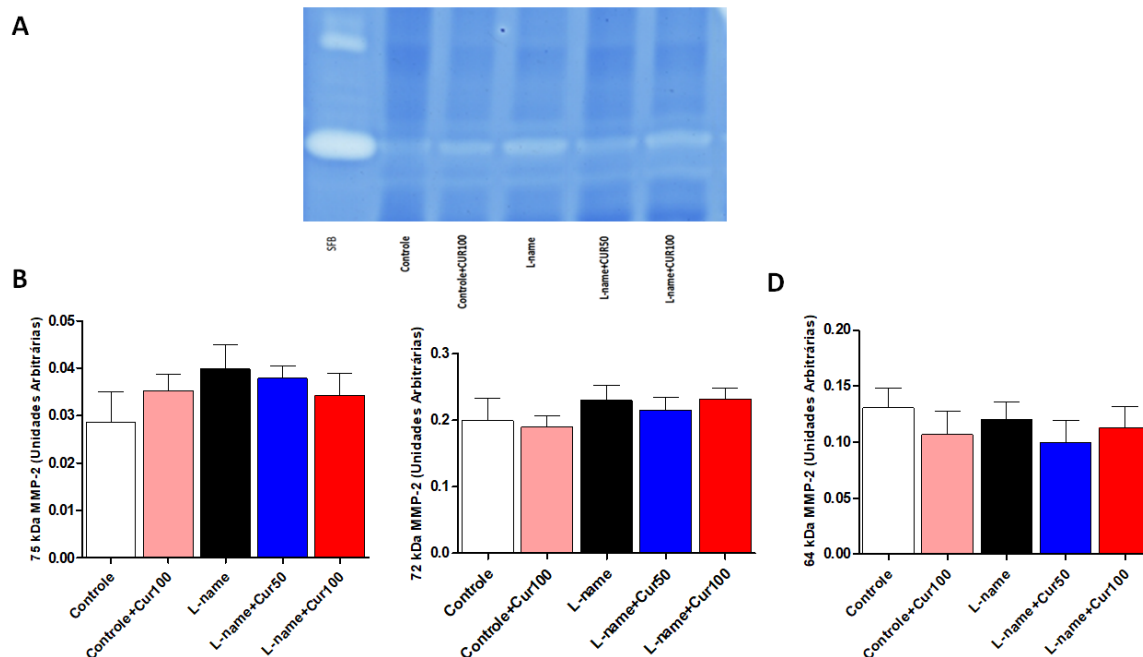
de maneira significativa pelo tratamento com a curcumina na dose de 100 mg/kg ($p < 0,05$ vs L-name veículo). Porém, a banda de MMP-2 ativa, de 64 kDa foi significativamente reduzida nos animais hipertensos pelos tratamentos com as duas doses de curcumina de maneira semelhante ($p < 0,05$; Figura 17 D).

Figura 17. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a expressão da MMP-2. (A) Gel representativo de zimografia de extrato de aorta. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 75 kDa MMP-2, (C) 72 kDa, (D) 64 kDa MMP-2 e (E) para a MMP-2 total. Valores expressos como média \pm EPM. N= 6-9/grupo. * $p < 0,05$ vs controle. # $p < 0,05$ vs L-NAME



Na Figura 18, é possível observar que não houve diferença significativa na expressão proteica da MMP-2 no coração de ratos hipertensos. O experimento será refeito para validação desses resultados, pois era esperado aumento de MMP-2 nos animais hipertensos como proteína que contribui para hipertrofia cardíaca que foi encontrada nos mesmos animais deste estudo. No entanto, é possível que apenas duas semanas de hipertensão não seja suficiente para aumentar MMP-2 no coração dos animais, como ocorreu na aorta neste mesmo estudo. Os achados sugerem que a expressão proteica vascular da MMP-2 é mais influenciada pelo aumento da pressão arterial do que no coração.

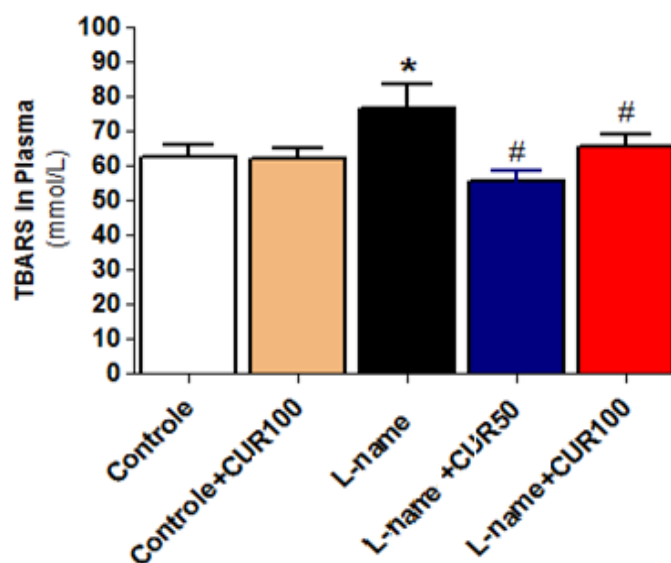
Figura 18. Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a expressão da MMP-2 no ventrículo esquerdo cardíaco. (A) Gel representativo de zimografia de extrato de ventrículo esquerdo. Representação gráfica dos valores para as bandas de peso molecular (B) 75 kDa MMP-2, (C) 72 kDa e (D) 64 kDa MMP-2. N= 10 animais/grupo.



5.5. Efeitos dos tratamentos com curcumina sobre o estresse oxidativo

Na figura 19 é possível observar um aumento significativo do TBARS no plasma dos animais do grupo L-NAME quando comparados aos animais controles ($p < 0,05$), sendo reduzido pelos animais tratados com curcumina, principalmente na dose de 50 mg/Kg ($p < 0,05$). Sendo assim, os resultados indicam que a curcumina reduz o estresse oxidativo.

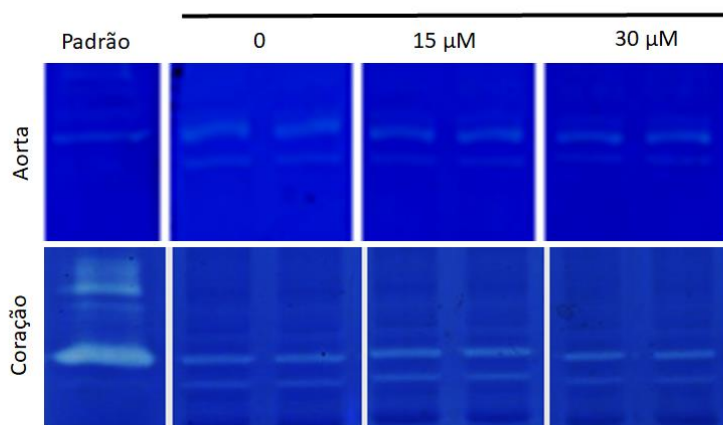
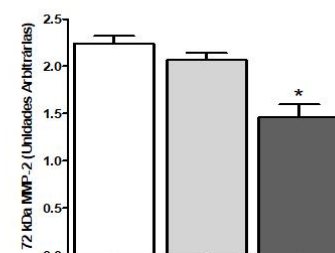
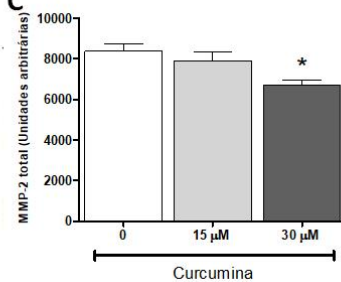
Figura 19 - Efeitos dos tratamentos com diferentes doses de curcumina sobre a formação de estresse oxidativo avaliado pela técnica de TBARS. Valores expressos como média \pm EPM. N=6-9/grupo. * $p < 0,05$ vs controle e # $p < 0,05$ vs L-NAME.



5.6 Efeitos diretos da curcumina sobre a atividade da MMP-2 em aorta e coração

Os resultados mostram que a curcumina promoveu inibição da atividade da MMP-2 de maneira significativa sendo menos ativada na presença da maior concentração de curcumina ($p < 0,05$ vs concentração 0 de curcumina) (Figura 20). É interessante observar que experimentos independentes realizados com aorta (Figura 20B) e coração (Figura 20C) mostram resultados extremamente semelhantes, validando a inibição direta da curcumina sobre a MMP-2.

Figura 20 - Efeitos da incubação *in vitro* com diferentes concentrações de curcumina sobre a atividade da MMP-2 em aorta e coração de ratos não tratados. (A) Gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de aorta e coração. Padrão: Soro Fetal Bovino. (B) Representação gráfica dos valores para a banda de peso molecular de 72 kDa. Valores expressos como média \pm EPM. N= 6-9/concentração. * $p < 0,05$ vs veículo (sem curcumina).

A**B****C**

6. DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é um dos principais problemas de saúde pública no mundo e está associada ao aumento da morbidade e mortalidade, sendo considerada importante fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares. A hipertensão crônica promove alterações estruturais e funcionais bem conhecidas nas artérias de resistência e condutância, e outros órgãos-alvo. Portanto, estratégias terapêuticas visando as alterações estruturais e funcionais podem prevenir doenças cardiovasculares (CASTRO; TANUS-SANTOS; GERLACH, 2011).

Atualmente, existem muitas estratégias para controlar e tratar a doença, seja por meio de terapias farmacológicas ou hábitos de vida e alimentação saudáveis, ainda assim há pouca adesão. Geralmente, a baixa adesão está diretamente relacionada as reações adversas decorrentes das terapias anti-hipertensivas disponíveis. Pensando nisso, é grande o interesse em novos agentes anti-hipertensivo com menos efeitos adversos e que podem contribuir para o tratamento HA.

A curcumina é um fenólico de coloração amarela intensa, isolado da planta *Curcuma longa* Linn. (Zingiberaceae). É muito utilizada como especiaria na culinária e tem despertado interesse na ciência devido as suas propriedades antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano e anticâncer, sendo reconhecida pelo FDA (Food and Drug Administration) como um composto seguro (HEWLINGS; KALMAN, 2017).

Embora estudos demonstrem inúmeros benefícios terapêuticos associados à curcumina, a maioria desses benefícios estão relacionados a propriedade antioxidante, sendo descritos em diferentes modelos experimentais de doenças como câncer, diabetes mellitus e na hipertensão (NAKMAREONG et al., 2011; RUNGSEESANTIVANON et al., 2010; KIM et al., 2015).

O efeito anti-hipertensivo da curcumina foi avaliado em diferentes modelos experimentais (BOONLA et al., 2014; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014). Os mecanismos associados aos efeitos benéficos da curcumina na HA ainda não estão totalmente esclarecidos, mas já foi descrito que este fenólico pode atenuar disfunção endotelial, aumentar biodisponibilidade do óxido nítrico, diminuir estresse oxidativo e também afetou alterações epigenéticas que resultaram em menor ativação de fatores pró-fibróticos, inclusive MMP-2 (BOONLA et al., 2014; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2014).

Apesar de sua eficácia e segurança, o potencial terapêutico da curcumina ainda é discutido devido a baixa biodisponibilidade e a sensibilidade ao metabolismo no trato

gastrointestinal. Alguns estudos buscam por alternativas para viabilizar seu uso com menor concentração utilizando nanopartículas, micelação e conjugação com outros materiais. Essas modificações podem aumentar sua estabilidade, solubilidade, absorção, bioatividade e segurança (CAS; GHIDONI, 2019). Porém, mesmo com baixa biodisponibilidade a curcumina ainda apresenta excelentes efeitos na HA.

A hipertrofia cardiovascular induzida pela hipertensão é a resposta adaptativa da parede vascular e do ventrículo esquerdo ao aumento crônico da pressão arterial (RIZZI et al., 2019). Embora o remodelamento cardiovascular na hipertensão possa inicialmente ser adaptativo, de modo a normalizar o estresse da parede vascular e do ventrículo esquerdo em resposta ao aumento da pressão arterial, pode se tornar mal-adaptativo e levar à insuficiência cardíaca.

Como citado anteriormente, existem diferenças quanto aos tipos de remodelamento vascular descrito para artérias de resistência e de grande calibre. O remodelamento eutrófico ocorre em artérias de resistência, e é caracterizado por uma diminuição no diâmetro do lúmen (M/L), com pouca ou nenhuma mudança na espessura da parede vascular. Já o remodelamento hipertrófico, ocorre principalmente nas grandes artérias ou artérias de condutância, tais como a aorta, e leva a um aumento significativo na espessura da parede vascular – Área de Secção Transversal (AST) (BELO et al., 2015). Ambos os tipos de remodelamento vascular envolvem degradação e reorganização estrutural da matriz extracelular (MEC) e hipertrofia ou hiperplasia das células do músculo liso vascular (CMLV), contribuindo assim para o espessamento da parede do vaso e rigidez vascular (CASTRO et al., 2011).

Semelhante às alterações encontradas nos vasos o remodelamento cardíaco é uma resposta morfológica adaptativa compensatória, denominada hipertrofia ventricular esquerda (HVE), e se caracteriza pelo aumento da massa do coração devido ao aumento do volume dos miócitos (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007; LEVY; LARSON; VASAN; KANNEL et al., 1996; LORELL; CARABELLO, 2000). No início a hipertrofia adaptativa ocorre no ventrículo esquerdo que cresce para dentro, o que resulta na redução da câmara do ventrículo esquerdo (RESTINI; GARCIA; NATALIN; NATALIN et al., 2017).

Como consequência a essa hipertrofia ocorre uma disfunção sistólica e diastólica e apesar de adaptativa e compensatória na maioria dos casos pode se tornar descompensada e mal adaptativa (BERK; FUJIWARA; LEHOUX, 2007), onde a câmara ventricular esquerda é dilatada, o ventrículo esquerdo é reduzido, assim como a parede do septo, levando a uma

menor força de contração pela perda de proteínas contráteis (RESTINI; GARCIA; NATALIN; NATALIN et al., 2017; ROSSI, 1998; ROSSI; CARILLO, 1991).

No presente estudo, observou-se aumento na espessura da camada média da aorta (AST) e, conseqüentemente aumento na razão M/L nos animais do grupo L-NAME, o que sugere a presença de remodelamento hipertrófico já previamente mostrado por outros trabalhos em artéria de grande calibre (KEARNEY et al., 2005; RIZZI et al., 2019). Sendo assim, o tratamento com curcumina mostrou efeitos benéficos na hipertrofia vascular independentemente da dose. Como HA está diretamente relacionada ao aumento na parede dos vasos, podemos sugerir que o remodelamento vascular foi atenuado pelos tratamentos com curcumina devido à redução na PAS. Porém, alguns trabalhos mostram que a redução na PAS nem sempre reduz o remodelamento vascular em animais hipertensos (MARTINS-OLIVEIRA et al., 2013). Neste sentido, é possível que a curcumina possa atenuar a lesão em órgãos-alvo, mesmo sendo menos efetiva na redução da PAS quando comparada com fármacos anti-hipertensivos já disponíveis. No entanto, essa sugestão necessita ser mais bem explorada para sua validação.

Em relação ao remodelamento cardíaco observou-se que a espessura do septo e do ventrículo esquerdo foi aumentada nos animais hipertensos. Os tratamentos com curcumina nas duas doses avaliadas reduziram semelhantemente o remodelamento cardíaco observado nos animais hipertensos. Em conjunto o estudo mostrou que a hipertrofia no ventrículo esquerdo e septo intraventricular encontrada nos animais hipertensos são decorrentes do aumento no tamanho dos cardiomiócitos. Como esperado devido aos resultados supracitados, os tratamentos com curcumina reduziram significativamente a hipertrofia nos cardiomiócitos nos animais hipertensos independente da dose. Portanto, os efeitos benéficos na hipertrofia cardiovascular associados aos tratamentos com curcumina foram independentes da dose.

Sendo as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) responsáveis pela degradação de produtos existentes na matriz extracelular, essas têm sido descritas como as principais envolvidas no remodelamento cardiovascular durante a HAS (WANG et al., 2017). Em alguns modelos de hipertensão observou-se a participação das MMPs, principalmente da MMP-2, nas alterações cardiovasculares funcionais e estruturais. Entre eles estão o modelo induzido por administração de L-NAME em ratos (BOUVET; GILBERT et al., 2005), e no modelo 2R-1C de hipertensão renovascular (CASTRO; RIZZI et al., 2009). Essas alterações cardiovasculares foram atenuadas por, um inibidor não específico de MMP (CASTRO; RIZZI, RODRIGUES et al., 2009).

Está bem estabelecido que durante a hipertensão, além das alterações cardiovasculares e funcionais, há o aumento significativo na geração de ERNO promovendo o estresse oxidativo (GUIMARÃES et al., 2010). Em conjunto, foi demonstrado em diversos estudos que ERNO aumentam a expressão e atividade de MMPs, especialmente MMP-2 (CASTRO et al., 2009).

Sabendo-se que os antioxidantes são eficazes na redução do estresse oxidativo em modelos experimentais de hipertensão, Castro et al demonstraram que o tratamento com o polifenol quercetina reduziu o estresse oxidativo, melhorou a biodisponibilidade do NO, e atenuou a disfunção endotelial e a pressão arterial em animais hipertensos renovascular (2R1C). A quercetina também reduziu a atividade de MMP-2.

Para verificar se a curcumina afetou a expressão das MMPs, especialmente a MMP-2, foi feito o ensaio de zimografia em gel. A zimografia em gel permite a separação das bandas com (72 kDa) e sem o pró-peptídeo (64 kDa) e a banda da MMP-2, considerada ativa, foi inibida pelas duas doses de curcumina.

Na zimografia em gel, durante o preparo das amostras, as proteínas foram extraídas da aorta e do coração e os inibidores de proteases foram separados da proteína durante o processamento das amostras. Devido a esse processo a atividade da MMP-2 observada no zimograma não reflete a atividade existente nos tecidos, mas sim a expressão das proteínas.

Como a curcumina possui ação antioxidante já descrita na literatura (RAJZER et al., 2017; CHEN et al., 2013), os efeitos sobre a formação de estresse oxidativo foi investigado no presente estudo por meio da técnica de TBARS. Dessa maneira, os resultados indicaram que a curcumina reduz o estresse oxidativo e é possível que este seja um dos mecanismos pelos quais a curcumina pode atenuar a atividade da MMP-2 e o remodelamento vascular, como encontrado no estudo.

Além da redução do estresse oxidativo, já foi mostrado por estudo de docking molecular que a curcumina pode ter interação direta com a MMP-2 (AHMAD et al., 2015). Por meio da técnica de zimografia *in vitro* foi possível confirmar a interação direta da curcumina com MMP-2. Esses achados sugerem que a curcumina pode atuar sobre a atividade da MMP-2 por mecanismos diferentes agindo diretamente sobre a gelatinase ou indiretamente, por meio da redução na formação de ERON.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os efeitos benéficos associados ao tratamento com curcumina foram independentes da dose, pois de maneira semelhante, a curcumina, nas duas doses avaliadas, preveniu o aumento na pressão arterial e não afetou o ganho de peso, atenuou o remodelamento cardiovascular, a atividade da MMP-2 e o estresse oxidativo em animais hipertensos induzidos por L-NAME.

Esses dados sugerem ainda que as MMPs são, portanto, consideradas promissores alvos terapêuticos, e sua inibição pode estar relacionada não somente a ação antioxidante, mas também por mecanismos de interação direta com esta protease, podendo assim prevenir e melhorar a hipertensão e seus eventos cardiovasculares.

Em conjunto os resultados dos efeitos benéficos da curcumina apresentados neste estudo, sugerem que esse fenólico poderá contribuir para o tratamento da HA, associado a fármacos anti-hipertensivos com mecanismos de ação conhecidos, atenuando o remodelamento cardiovascular e reduzindo a atividade da MMP-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. et al., Molecular docking and inhibition of matrix metalloproteinase-2 by novel difluorinatedbenzylidene curcumin analog - **Am J Transl Res** 2015;7(2):298-308

AHMAD, A. et al. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2018.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, v. 4, n.6, p. 807-18, 2007.

BARROSO et al. - **Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial**, 2020

BELO, V.A.; GUIMARÃES, D.A.; CASTRO, M.M. Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension. **Journal of vascular research**, v. 52, n. 4, p. 221-231, 2015.

BERK, B. C.; FUJIWARA, K.; LEHOUX, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. **J Clin Invest**, 117, n. 3, p. 568-575, Mar 2007.

BOONLA, O. et al. Curcumin improves endothelial dysfunction and vascular remodeling in 2K-1C hypertensive rats by raising nitric oxide availability and reducing oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 42, p. 44-53, 2014.

BOUVET, C.; GILBERT, L A; GIRARDOT, D et al. Envolvimento diferente de componentes da matriz extracelular em artérias pequenas e grandes durante a inibição crônica da NO sintase. **Hipertensão**, 2005. v. 45, n.3, p.432-7

CAREY, R.M., MUNTNER P, BOSWORTH HB, WHELTON PK. Prevention and control of hypertension. Jacc health promotion series. **J am coll cardiol**. 2018;71(19):2199-269

CARVALHO MHC, NIGRO D, LEMOS VS, TOSTES RCA, FORTES ZB Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens** VOL 8(1): JANEIRO/MARÇO DE 2001.

CAS M D; GHIDONI R. Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. **Nutrients** 2019, 11, 2147.

CASTRO, M.M., RIZZI E., RODRIGUES, G J et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 9, p.1298-307, 2009.

CASTRO, M.M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 128, p. 320-31, 2008.

CASTRO, M.M; TANUS-SANTOS, J.E; GERLACH F.R. Matrix metalloproteinases: Targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacological Research**, 2011. v. 64, n.6, p. 567-572.

CAU, S.B. et al. The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.117, n.4, p. 234-41, 2015.

CERON, C.S. et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 1, p. 77-87, 2010.

CHEN, Q. et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p.14, 2013.

DATLA, S.R.; GRIENGLING, K.K. Reactive oxygen species, NADPH oxidases, and hypertension. **Hypertension**, v. 56, n.3, p. 325-30, 2010.

EAF, SILVA EN, JAIME PC. Developing and applying a costing tool for hypertension and related cardiovascular disease: attributable costs to salt/ sodium consumption. **J Clin Hypertens**. 2020;22(4):642-8.

EIRA, J. D. et al. Factors associated with systemic hypertension and nutritional status of hypertensive enrolled in the program Hiperdia. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p.129-134, 2013.

G. YETIK-ANACAK, J.D. Catravas / nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular **Disease Vascular Pharmacology** 45 (2006) 268–276

GOSHI E, ZHOU G, HE Q. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo. **Med gas res**. 2019;9(4):192-207

GRIENGLING, K. K. et al. NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation research**, v.86, n.5, p. 494-501, 2000.

GUIMARÃES et al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens** VOL.17(4):226-230, 2010

GUIMARAES, D.A. et al. Doxycycline Dose-dependently Inhibits MMP-2-Mediated Vascular Changes in 2K1C Hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2010. v. 108, p. 318–325.

HADI A.; POURMASOUMIB M.; GHAEDI E.; SAHEBKAR A. The effect of Curcumin/Turmeric on blood pressure modulation: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacological Research**, 2019, v 150.

HEWLINGS S. J.; KALMAN D. S. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health **Foods** 2017, 6, 92;

INTENGAN, H.D.; SCHIFFRIN, E.L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, Dallas, v. 38, p. 581-7, 2001.

JACOB-FERREIRA A.L.; SCHULZ R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. **Arch Biochem Biophys**, v. 540, n.1-2, p. 82-93, 2013.

JAMWAL, R. Bioavailable curcumin formulations: A review of pharmacokinetic studies in healthy volunteers. **J Integr Med**, v. 16, n. 6, p. 367-374, 2018.

KAPLAN, N. M.; VICTOR, R. G. **Hipertensão Clínica de Kaplan**. 10. ed. ArtMed, 2015

KEARNEY, P.M. et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The lancet journals**, London, v. 365 p. 217-23, 2005.

KIM, K.C., et al. Curcumin-induced downregulation of Axl receptor tyrosine kinase inhibits cell proliferation and circumvents chemoresistance in non-small lung cancer cells. **Int J Oncol**, v. 47, n. 6, p. 2296-303, 2015.

KUKONGVIRIYAPAN, U. et al. Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. **Nutrients**, v. 6, n. 3, p. 1194-208, 2014.

LEVY, D.; LARSON, M. G.; VASAN, R. S.; KANNEL, W. B. et al. The progression from hypertension to congestive heart failure. **Jama**, 275, n. 20, p. 1557-1562, May 22-29 1996.

LI, C. et al. Curcuminoids: Implication for inflammation and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 5, p.1302-1317, 2019.

LIMA, F.T. et al. The Curcumin Analog CH-5 Exerts Anticancer Effects in Human Osteosarcoma Cells via Modulation of Transcription Factors p53/Sp1. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 7, , 2018.

LIN, Z. et al. Fibulin-3 may improve vascular health through inhibition of MMP-2/9 and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Mol Med Rep**, v. 13, n. 5, p. 3805-12, 2016.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, 102, n. 4, p. 470-479, Jul 25 2000.

MALACHIAS, M.V.B. et al. **Diretriz brasileira de hipertensão arterial**. 7. ed. Rio de Janeiro: Arquivos brasileiros de cardiologia, 2016.

MARTINS-OLIVEIRA A. et al. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 4, p. 1199-1205, 2013.

NAKMAREONG, S. et al. Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 2011. v. 383, n.5, p. 519-29.

NILSON E. A. F.; ANDRADE R. C. S.; BRITO D. A.; OLIVEIRA M. L. Custos atribuíveis à obesidade, hipertensão e diabetes no sistema único de saúde em 2018. **Rev Panam Salud Publica**. 2020;44:E32.

OPIE, L. H.; COMMERFORD, P. J.; GERSH, B. J.; PFEFFER, M. A. Controversies in ventricular remodelling. **Lancet**, 367, n. 9507, p. 356-367, Jan 28 2006.

PEREIRA, S. C.; PARENTE J. M.; BELO V. A. et al. Quercetin decreases the activity of matrix metalloproteinase-2 and ameliorates vascular remodeling in renovascular hypertension. **Atherosclerosis** 270 (2018); 146 – 153.

PRÉCOMA .B.; OLIVEIRA G. M. M.; SIMÃO A. F.; et al., Atualização da diretriz de prevenção cardiovascular da sociedade brasileira de cardiologia – 2019. **Arq Bras Cardiol**. 2019; 113(4):787-891.

PRESTE et al., Disfunção endotelial: oportunidade terapêutica para as estatinas - Publ. UEPG Ci. **Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.22, n.2, p. 147-160, jul./dez. 2016

QIANG MA - Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 2013 ; 53: 401–426. doi:10.1146

RAJZER, M. et al. The effect of antihypertensive treatment on arterial stiffness and serum concentration of selected matrix metalloproteinases. **Arch Med Sci**, v. 13, n. 4, p. 760-770, 2017.

RESTINI, C. B. A.; GARCIA, A. F. E.; NATALIN, H. M.; NATALIN, G. M. et al. Signaling Pathways of Cardiac Remodeling Related to Angiotensin II. **Renin-Angiotensin System: Past, Present and Future**, p. 51, 2017.

RIZZI, E. et al. beta1-Adrenergic blockers exert antioxidant effects, reduce matrix metalloproteinase activity, and improve renovascular hypertension-induced cardiac hypertrophy. **Free Radic Biol Med**, v.73, p. 308-17, 2014.

RIZZI, E. et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Arch Toxicol**, 2009. v. 83, n. 5, p. 439-49, 2009.

RIZZI, E. et al. Tempol inhibits TGF-beta and MMPs upregulation and prevents cardiac hypertensive changes. **Int J Cardiol**, v. 165, n.1, p. 165-73, 2013.

RIZZ, E. et al. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free Radical Biology and Medicine** 130 (2019) 234–24

ROSSI, M. A. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. **J Hypertens**, 16, n. 7, p. 1031-1041, Jul 1998.

ROSSI, M. A.; CARILLO, S. V. Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena? **Int J Cardiol**, 31, n. 2, p. 133-141, May 1991.

RUDDY, J.M. et al. Differential effects of mechanical and biological stimuli on matrix metalloproteinase promoter activation in the thoracic aorta. **Circulation**, v. 120, n.11, p. S262-8, 2009.

RUNGSEESANTIVANON S.; NARIS T.; PREECHA R. et al. Curcumin supplementation could improve diabetes-induced endothelial dysfunction associated with decreased vascular superoxide production and PKC inhibition **BMC Complementary and Alternative Medicine** 2010.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 211-42, 2007.

SILVA, G. et al. Curcumin Analog CH-5 Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of the Human Gastric Cancer Cell Line HGC-27. **Molecules**, v. 23, n. 2, p.279, 2018

SILVEIRA, J. D. et al. Factors associated with systemic hypertension and nutritional status of hypertensive enrolled in the program Hiperdia. **Cadernos Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n.2, p. 129-134, 2013.

SILVEIRA, J. D. et al. Factors associated with systemic hypertension and nutritional status of hypertensive enrolled in the program Hiperdia. **Cadernos Saúde Coletiva**, 2013. v. 21, n. 2, p.129-134.

SIMKO, F. et al. Effect of melatonin on the renin-angiotensin-aldosterone system in L-NAME-Induced hypertension. **Molecules**, 2018. v. 23, n. 2, p. 265.
superoxide production and PKC inhibition. **BMC Complement Altern Med**, v. 10, p. 57, 2010.

TOUYZ, R. M. ; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, n. 4, p. 339-352, 2004.

WANG X.; KHALIL R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Advances in pharmacology**, v 81- cap 8 – 2017

XU X-Y.; MENG X.; LI S.; GAN R-Y.; YA L.; LI H-B. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. **Nutrients** v 10, p 1553, 2018.

ANEXO

ANEXO A- Aprovação do comitê de ética



Ribeirão Preto, 16 de março de 2018.

Prezado(a) Pesquisador (a) Dr^a Ellen Rizzi Sanchez

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada “EFEITOS DA CURCUMINA E CURCUMINOIDES CH5 SOBRE AS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDIOVASCULARES, ESTRESSE OXIDATIVO E AUMENTO DA METALOPROTEÍNASE DA MATRIZ EXTRACELULAR (MMP)-2 DECORRENTES DA HIPERTENSÃO ARTERIAL”, registrada sob o nº 13/2017”, e sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Dr^a Ellen Rizzi Sanchez, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 28/02/2018.

* Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.


Prof.^a Luciana Rezende Alves Oliveira

**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Ribeirão Preto**

Finalidade: <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Vigência da Autorização: a partir de 28/02/2017
Espécie / Linhagem / Raça: Ratos Wistar Norvegicus
Nº de Animais: 200
Peso / Idade: 200g/35 dias
Sexo: M
Origem: Biotério da Unaerp